

**Entwicklung und Charakterisierung von
nanoskaligen, liposomalen Ultraschallkontrastmitteln
zum Plaque-Targeting
sowie
Aufbau eines *in vitro*-Plaque-Modells**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

**Elena Eva Julianne Marxer
aus Nürnberg**

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 18.12.2012 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Udo Bakowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung am 19.12.2012.

Die vorliegende Arbeit entstand
auf Anregung und unter Anleitung von

Prof. Dr. Udo Bakowsky

am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
der Philipps-Universität Marburg

Gewidmet meinen Eltern

Julianne und Hans

und meiner Schwester

Linda

in Liebe und Dankbarkeit.

„Tue es oder tue es nicht. Es gibt kein Versuchen.“

(Meister Yoda in Star Wars Episode V)

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG: ULTRASCHALL, ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND ARTERIOSKLEROSE	2
1.1 AUFGABENSTELLUNG	2
1.2 ULTRASCHALL	4
1.2.1 GRUNDLAGEN	4
1.2.2 ANWENDUNG VON ULTRASCHALL	7
1.2.3 ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL	8
1.3 NANOSKALIGE TRÄGERSYSTEME	12
1.3.1 LIPOSOMEN	12
1.3.2 POLYMER-NANOPARTIKEL	13
1.4 ARTERIOSKLEROSE	14
1.4.1 ENTSTEHUNG UND FOLGEERKRANKUNGEN DER ARTERIOSKLEROSE	14
1.4.2 IN VIVO DARSTELLUNG VON ARTERIOSKLEROTISCHEN PLAQUES	17
2. METHODEN	20
2.1 HERSTELLUNG UND PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON NANOSKALIGEN ULTRASCHALLKONTRASTMITTELN UND POLYMER-NANOPARTIKELN	20
2.1.1 HERSTELLUNG	20
2.1.2 ANTIKÖRPER-KOPPLUNG	23
2.1.3 GRÖÖE UND ZETAPOTENTIAL	27
2.1.4 MORPHOLOGIE	29
2.2 ULTRASCHALLAKTIVITÄT	32
2.2.1 AUFBAU DES FLUSSMODELLS	32
2.2.2 MESSUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES	33
2.2.3 AUSWERTUNG DER ULTRASCHALLBILDER	34
2.3 VERBESSERUNGEN DES ULTRASCHALLKONTRASTES	35
2.3.1 VARIATION DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG	35
2.3.2 VARIATION DER HERSTELLUNGSMETHODE	36
2.3.3 GEFRIERTROCKNEN	37
2.3.4 MESSUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES	37
2.3.5 AUSWERTUNG DER ULTRASCHALLBILDER	37
2.4 MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN	39
2.4.1 GRUNDLAGEN ZUM RASTERKRAFTMIKROSKOP UND KRAFTMESSUNGEN	39
2.4.2 DURCHFÜHRUNG DER KRAFTMESSUNGEN	42
2.4.3 AUSWERTUNG DER KRAFTKURVEN	43

2.5 PLAQUE TARGETING	44
2.5.1 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	45
2.5.2 FLUSSMODELL MIT <i>IN VITRO</i> PLAQUE-MODELL	47
3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL	51
3.1 ERGEBNISSE	52
3.1.1 GRÖÖE, ZETAPOTENTIAL	52
3.1.2 MORPHOLOGIE	59
3.2 DISKUSSION	66
4. ULTRASCHALLKONTRASTMESSUNGEN	73
4.1 ERGEBNISSE	73
4.1.1 VERSCHIEDENE HERSTELLUNGSMETHODEN	73
4.1.2 KOPPLUNG VON ANTIKÖRPERN	75
4.1.3 MITTLERE GRAUWERTE	76
4.1.4 MEDIUM	77
4.2 DISKUSSION	79
5. VERBESSERUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES	85
5.1 ERGEBNISSE	85
5.1.1 HERSTELLUNGSMETHODEN	85
5.1.2 LIPIDZUSAMMENSETZUNG	88
5.1.3 GEFRIERTROCKNEN	90
5.2 DISKUSSION	95
6. MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN	100
6.1 ERGEBNISSE DER KRAFTMESSUNGEN	100
6.2 DISKUSSION	105
7. <i>IN VITRO</i> PLAQUE-TARGETING	110
7.1 ERGEBNISSE	110
7.2 DISKUSSION	115
8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	121
8.1 ZUSAMMENFASSUNG	121
8.2 AUSBLICK	124
9. LITERATURVERZEICHNIS	127
10. ANHANG	136
10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136
10.2 TABELLEN	139
10.3 PUBLIKATIONSLISTE	144

10.4 LEBENSLAUF	148
10.5 DANKSAGUNG.....	149

KAPITEL 1:EINLEITUNG:

**ULTRASCHALL, ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND
ARTERIOSKLEROSE**

1. EINLEITUNG: ULTRASCHALL, ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND ARTERIOSKLEROSE

1.1 AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von neuen, lipidbasierten, nanoskaligen Formulierungen zur Anwendung als Ultraschallkontrastmittel und zum spezifischen Targeting von arteriosklerotischen Plaques. Hierbei wurde besonders darauf geachtet, dass die entwickelten Formulierungen, eine sehr gute Kontrastverstärkung bei diagnostischen Ultraschalluntersuchungen (Frequenzen zwischen 1 und 3 MHz) erzeugen. Die Formulierungen wurden physikochemisch und morphologisch charakterisiert sowie im Hinblick auf brillante Kontrastverstärkung optimiert. Außerdem wurde eine Methode entwickelt elastische Eigenschaften nanoskaliger Systeme mit dem Rasterkraftmikroskop zu messen und dies am Beispiel von Polymer-Nanopartikeln durchgeführt. Die Ultraschallkontrastmittel sollten zusätzlich gute Targeting-Eigenschaften aufweisen. Dazu wurde ein *in vitro* Plaque-Modell entwickelt und weitere liposomale Ultraschallkontrastmittel hergestellt, die mit Antifibrin-Antikörpern gekoppelt wurden. Diese wurden ebenfalls physikochemisch charakterisiert und die Targeting-Eigenschaften mit dem *in vitro* Plaque-Modell getestet.

In **Kapitel 1** (Einleitung) werden Grundlagen und die Anwendung von Ultraschall in Diagnose und Therapie dargestellt sowie besonders die Anwendung von ultraschallkontrastverstärkenden Mitteln zur Unterstützung von Ultraschalluntersuchungen präsentiert. Ein kurzer Überblick zur Gefäßkrankheit Arteriosklerose, die Visualisierung dieser Erkrankung und *in vivo* Charakterisierungsmöglichkeiten wird gegeben.

In **Kapitel 2** werden die verwendeten Methoden zur Herstellung und Charakterisierung der nanoskaligen, liposomalen Ultraschallkontrastmittel und der Nanopartikel sowie die Ermittlung der Kontraststärke erläutert.

Kapitel 3 befasst sich mit den Ergebnissen der physikochemischen und morphologischen Charakterisierung der hergestellten liposomalen Formulierungen sowie von Polymer-Nanopartikeln. Dazu wurden Dynamische Lichtstreuung, Laser-Doppler-Anemometrie, Rasterkraftmikroskopie, Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie und Phosphat-31-Kernspinresonanzspektroskopie verwendet.

Kapitel 4 zeigt die Ergebnisse der Ultraschallkontrastmessungen und der Untersuchungen zur Lagerungsstabilität der Formulierungen im Hinblick auf den Ultraschallkontrast. Die Ultraschallkontrastmessungen wurden mit einem speziellen Flussmodell bestimmt.

Kapitel 5 befasst sich mit der Verbesserung der Kontrastintensität durch Variation der Herstellungsmethode, der Lipidzusammensetzung, sowie Gefriertrocknen.

In **Kapitel 6** wird ein Modellsystem zur Bestimmung elastischer Eigenschaften mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops entwickelt und am Beispiel von Polymer-Nanopartikeln getestet.

Kapitel 7 stellt ein *in vitro* Plaque-Modell zur Untersuchung der spezifischen Targeting-Eigenschaften vor.

Kapitel 8 fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen und gibt einen Ausblick.

1.2 ULTRASCHALL

1.2.1 GRUNDLAGEN

Wenn in einem Medium ein Atom oder Molekül zur Eigenschwingung angeregt wird, wird diese Schwingung auf das benachbarte Molekül übertragen, von dort zum nächsten und immer so weiter. Diese kinetische Energie verbreitet sich sinusförmig im Medium. Man bezeichnet die kontinuierliche Übertragung der kinetischen Energie als akustische Welle. Im Medium treten abwechselnd Kompressions- und Kavitationsphasen auf. Dabei können Atome oder Moleküle longitudinal (in Ausbreitungsrichtung) und transversal (senkrecht zur Ausbreitungsrichtung) zur Richtung der Anregung schwingen. Deshalb unterscheidet man bei akustischen Wellen zwischen Longitudinal- und Transversalwellen. ¹

Ultraschall bezeichnet Schall mit einer Frequenz größer als 20 kHz. Der für den Menschen hörbare Frequenzbereich liegt zwischen 20 Hz und annähernd 20 kHz und damit unterhalb des Ultraschalls. Diagnostisch eingesetzter Ultraschall liegt normalerweise in einem Bereich von 1 – 40 MHz. Frequenzen dieser Höhe können nicht durch Luft übertragen werden, aber sie gehen durch Flüssigkeiten oder festes Material hindurch. Deshalb werden luftblasenfreie Ultraschallkontaktgele bei diagnostischen und therapeutischen Ultraschalluntersuchungen benutzt. Der Schallkopf eines Ultraschallgerätes sendet Ultraschallwellen als Pulse mit wenigen μ s und einer bestimmten Frequenz aus. Die Schallwellen bewegen sich durch das Gewebe und werden an verschiedenen Gewebestrukturen unterschiedlich stark reflektiert. Das reflektierte Signal, das nur einen kleinen Teil der ausgesendeten Ultraschallenergie ausmacht, wird vom Schallkopf wieder empfangen und in ein Ultraschallbild umgewandelt. ²

Die durch die Ultraschallwellen verursachten Druckschwankungen im Gewebe, führen dazu, dass während der Kavitationsphase (auch Sog-Phase genannt) Gas aus Gewebsflüssigkeit

herausgezogen wird, welches Bläschen bildet. Diese Bläschen schwingen in ihrer Größe, aufgrund des wechselnden Gewebedrucks und können sogar kollabieren, was zu örtlich begrenzter Energiefreisetzung und Temperaturerhöhung im mikroskopischen Bereich führt. Dieses Phänomen wird *inertial cavitation* genannt (Abbildung 1).³

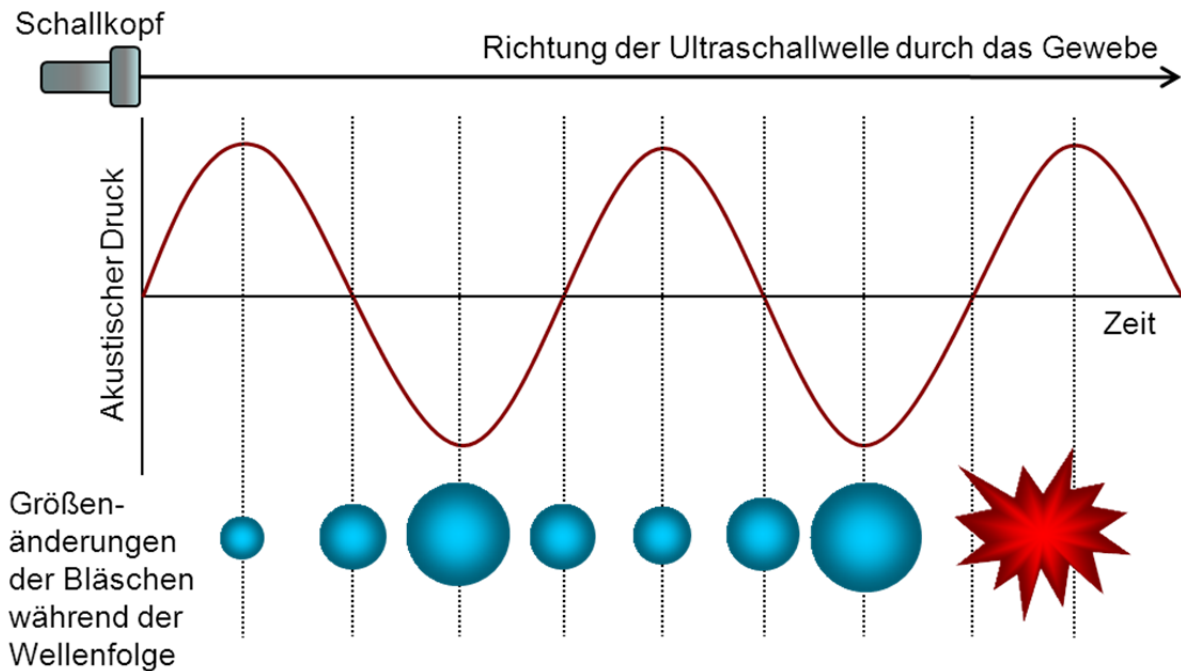


Abbildung 1: Einfluss von Ultraschallwellen und Druck auf die Größe von Gasbläschen (Skizze abgewandelt übernommen aus Referenz³).

Seit Beginn der Ultraschalldiagnostik beim Menschen in den 1960er Jahren werden mögliche biologische Effekte diskutiert. In Verbindung mit Ultraschallstrahlen, die durch den Körper gehen, treten zwei verschiedene Phänomene auf, von denen bekannt ist, dass sie möglicherweise einen Einfluss auf biologische Systeme haben. Hierbei handelt es sich zum einen um thermische Effekte, da ein Teil der vom Körper absorbierten Energie in Hitze umgewandelt wird, und zum anderen um mechanische Effekte, bei denen von durch Druckschwankungen entstandene und evtl. auch implodierende Gasbläschen einen starken Druckanstieg verursachen können, welcher Zellmembranen sogar zum Platzen bringen kann.

Unterschiedliche biologische Gewebe zeigen unterschiedliches Absorptionsverhalten der Schallenergie. In Flüssigkeiten, wie Blut oder Urin, ist die Absorption sehr schlecht, in Knochen dagegen mit 60 – 80% sehr hoch. Verantwortlich für thermische Effekte ist die Ultraschallfrequenz. Je höher die Frequenz, desto schneller wird die Ultraschallenergie absorbiert. Eine Temperaturerhöhung um 2,5 °C und mehr kann ernsthafte Schäden bei biologischen Geweben verursachen, während Temperaturerhöhungen um 1 °C als sicher angesehen werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass im diagnostischen Bereich keine schädlichen thermischen Effekte zu erwarten sind.¹

Mechanische biologische Effekte sind fast immer Phänomene, die mit dem Auftreten und dem möglichen Kollaps der mikroskopisch kleinen Bläschen, die im Gewebe vorkommen, zusammenhängen. Das Auftreten und der Einfluss der Sog-Phase sind nicht nur abhängig von der gewählten Ultraschallfrequenz und Intensität, sondern auch von der Fokussierung des Ultraschallfeldes. Beim Kollabieren der Bläschen kann es zu einem plötzlichen Temperatur- oder Druckanstieg in einem Bereich kommen, der kleiner ist als ein Quadratmikrometer. Dies kann als letzte Konsequenz die Zerstörung von Zellen und Gewebe zur Folge haben. Es ist wissenschaftlich erwiesen, dass die Sog-Phase in ihrer vorübergehenden Form ein reines Schwellenphänomen ist, das nur dann auftritt, wenn sowohl der Druck, als auch die Ultraschallfrequenz, bei gleichzeitigem Auftreten von Kavitationszellen, auf extreme Werte eingestellt sind. Liegt der Druck unterhalb des Kavitationsschwellenwertes, wird dies allein, selbst bei extrem langen Beschallungszeiten, nie zu Kavitationen führen. Bis heute ist kein Fall bekannt, bei dem die Beschallung eines menschlichen Körpers im diagnostischen Bereich, selbst vorübergehend, ein Kavitationsphänomen verursacht hat. Allerdings ist der Nachweis von biologischen Effekten sehr schwierig bis unmöglich, da sich die negativen Effekte möglicherweise nur auf wenige Zellen auswirken, wobei Kavitation an jeder beliebigen Stelle im Gewebe auftreten kann. Die heute gebräuchlichen

Ultraschallkontrastmittel wurden im Hinblick auf Kontrollwerte so produziert, dass das Auftreten von möglichen mechanischen Effekten, wie Kavitation, während extremem Spitzendruck, durch eine Beschränkung der durchschnittlichen Pulsintensität vermieden werden kann.¹

1.2.2 ANWENDUNG VON ULTRASCHALL

Ultraschall wird in vielen medizinischen Bereichen eingesetzt. Es ist erwiesen, dass Ultraschallenergie den Transport von Wirkstoffen durch die Haut verbessern kann. Außerdem wurde festgestellt, dass niedrig-frequenter Ultraschall (20 – 100 kHz) die besten Ergebnisse für den transdermalen Transport erzielt⁴. Tezel *et al.* zeigten, dass Ultraschall, durch *inertial cavitation*, Schockwellen und Microjets verursachen kann, was zu verbesserter transdermaler Permeabilität führt⁵. Die sog. Sonophorese wird eingesetzt, um bspw. Lidocain oder Impfstoffe durch die Haut zu bringen⁶. Anna Y. *et al.* konnten *in vivo* die intrazelluläre Freisetzung von Molekülen, die nicht durch Zellmembranen gehen können, via ultraschall-induzierter Permeabilitätserhöhung der Zellmembran, gefolgt von temperaturkontrollierter Freisetzung der Testsubstanzen, zeigen⁷. Ultraschallenergie kann zudem zur Auflösung von Thromben genutzt werden. Alonso *et al.* setzten menschliche Thromben in Karotis-Arterien von 16 Ratten ein und behandelten diese mit 2 MHz Ultraschall – entweder mit Ultraschall alleine, mit Ultraschall in Kombination mit Immuno-Bläschen, die auf Plättchen gerichtet sind oder mit unspezifischen Immuno-Bläschen, aber sie benutzten keine lytischen Wirkstoffe. Sie stellten fest, dass die spezifischen Immuno-Bläschen ein stärkeres Auflösen der Thromben verursachten, als Beschallung mit unspezifischen Immuno-Bläschen oder Ultraschall alleine⁸. Eine weitere Arbeitsgruppe verwendete den Thrombolyse-Wirkstoff tPA. Sie untersuchte die thrombolytische Effizienz des Wirkstoffs sowohl allein, als auch in Kombination mit Ultraschall (1 MHz) sowie in Bläschen integriert. Dabei wurden gute Thrombus-

Auflösungseigenschaften für die Kombination des Wirkstoffes mit den Bläschen festgestellt ⁹. Ultraschall kann außerdem die Heilung von Knochenbrüchen verbessern. Unter Verwendung verschiedener Frequenzen ließen sich in einem Kaninchen-Knochenbruch-Modell bessere Ergebnisse, in Hinblick auf Knochenformation und Drehfestigkeit, erzielen, als bei der Kontrollgruppe ¹⁰.

1.2.3 ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL

Die Anwendung von Ultraschallkontrastmitteln wurde zum ersten Mal 1968 getestet. Gramiak und Shah injizierten Patienten mit Mitralstenose Salzlösung als ein intrakardiales Ultraschallkontrastmittel und konnten beweisen, dass dies ein effektives Ultraschallkontrastmittel darstellte. Sie erklärten, dass die Echo-Wolken durch Mini-Bläschen hervorgerufen wurden, die beim schnellen Injizieren entstanden oder auch schon im Kontrastmittel enthalten sein konnten ¹¹. Daraufhin wurden weitere Untersuchungen zur Ultraschallkontrastverstärkung unternommen. 1972 testeten Ziskin *et al.* verschiedene Medien, wie destilliertes Wasser, gewöhnliche Salzlösung, 5%ige Dextroselösung, Indocyaningrün oder Ether auf ihre kontrastverstärkende Wirkung und den Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit auf die Kontrastverstärkung. Dabei fand man heraus, dass durch eine schnelle Injektionsrate (10 ml/sec), selbst mit destilliertem Wasser, eine Kontrastverstärkung verursacht werden konnte ¹². Feinstein *et al.* gingen 1984 noch einen Schritt weiter. Sie verwendeten die eben erwähnten Kontrastmittel und variierten die Herstellungsmethode. Sie stellten fest, dass bessere Ergebnisse erzielt werden konnten, wenn die Lösungen bei der Herstellung mit einem Ultraschallstab beschallt wurden, anstatt sie nur mit der Hand zu schütteln, da mit dem Ultraschallstab kleine und stabile Mikrobläschen erzeugt würden ($13 \pm 5 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $16 \pm 13 \mu\text{m}$ beim Schütteln von Hand) ¹³.

Anschließend wurde die sog. erste Generation von Ultraschallkontrastmitteln entwickelt. Diese Kontrastmittel waren Mikrobläschen mit kleinen Größen ($1 - 8 \mu\text{m}$), die aus Luft, umgeben von einer Albumin-Hülle (Albunex®), bestanden. Aufgrund ihrer dünnen Hülle und der guten Löslichkeit von Luft in Blut, hielt die Kontrastverstärkung jedoch nur wenige Sekunden an. Die zweite und dritte Generation der Ultraschallkontrastmittel nutzten Gase mit hohem Molekulargewicht, wie z.B. Schwefelhexafluorid, und Proteinhüllen, sowie Lipid- oder Polymerhüllen, was die Freisetzung des Gases reduzierte und die Stabilität der Kontrastmittel im Blutfluss verbesserte¹⁴. Beispiele FDA-geprüfter Ultraschallkontrastmittel der zweiten Generation sind Optison® und Definity®. In Europa ist SonoVue® am gebräuchlichsten¹⁵.

In den letzten Jahren wurden Kontrastmittel entwickelt, die kleiner als $1 \mu\text{m}$ sind und dennoch eine gute Ultraschallkontrastverstärkung aufweisen. Diese nanoskaligen Kontrastmittel sind häufig Liposomen¹⁶, die zusätzlich mit Antikörpern konjugiert¹⁷ oder auch als Wirkstofffreisetzungssysteme verwendet werden können¹⁸, da sie sowohl hydrophile Substanzen in ihrem Kern, als auch lipophile Substanzen in ihrer doppelschichtigen Hülle enthalten können¹⁹.

Ultraschalldiagnose und -therapie haben positive, aber auch einige negative Nebeneffekte. Positive Effekte bei Verwendung von Ultraschallkontrastmitteln sind Wirkstofffreisetzung und auch Gentransfer, wenn die Bläschen bei hohem Mechanischem Index zerstört werden. Negative Auswirkungen von Kontrastmittelunterstützten Ultraschalluntersuchungen wären beispielsweise Hämolyse und Plättchen-Aggregation oder auch Endothelschäden²⁰.

Für das sogenannte *Harmonic Imaging* wird eine nichtlineare Bläschen-Schwingung benötigt. Dies kann mit einem Mechanischen Index (MI) zwischen 0,1 und 1,0 erreicht werden. Bei einem $\text{MI} < 0,1$ tritt lineare Rückstreuung auf und bei einem $\text{MI} > 1$ werden die Bläschen zerstört. Siehe dazu auch Abbildung 2²⁰.

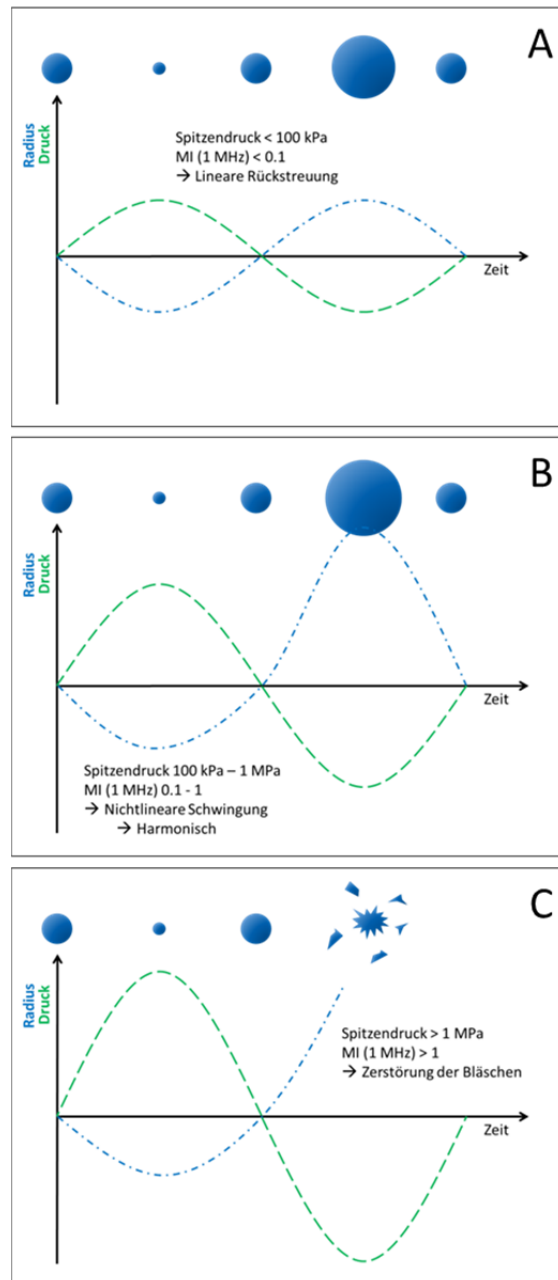


Abbildung 2: Einfluss des Mechanischen Index (MI) auf Bläschen. A) Bei niedrigem MI ($< 0,1$) schwingen die Bläschen linear. B) Bei steigendem MI beginnen die Bläschen nichtlinear zu schwingen, was zu messbaren harmonischen Reflexionen führt. C) Bei hohem MI (> 1) kommt es zur *inertial cavitation*, was bedeutet, dass die Bläschen in der Sog-Phase zerstört werden. (Grafik übernommen und abgewandelt aus Referenz²⁰).

Der Mechanische Index, MI, ist definiert als

$$MI = \frac{p}{\sqrt{f}}$$

Dabei steht p für den Druck in MPa und f ist die Frequenz in MHz. Bei höherem Druck und kleinerer Frequenz erhöht sich die Stärke und Wahrscheinlichkeit von *inertial cavitation* ²¹.

Akustische Kavitation ist die zu beobachtende Aktivität von Bläschen, wenn sie einem akustischen Feld ausgesetzt werden ²².

Die Resonanzfrequenz f_r (MHz) eines kugelförmigen Gasbläschens, in Wasser bei 20 °C und atmosphärischem Luftdruck, wird durch die folgende Gleichung beschrieben (R_0 ist der Bläschenradius in μm):

$$f_r \sim \frac{3.3}{R_0}$$

Mit dieser Formel kann die Resonanzfrequenz eines käuflichen Ultraschallkontrastmittels, das Mikrobläschen (1 – 10 μm) enthält, berechnet werden. Die Resonanzfrequenz liegt zwischen 0,33 und 3 MHz. Deshalb wird für die lokale Wirkstofffreisetzung in der Regel eine Ultraschallfrequenz von 1 MHz angewendet ²¹. Würde man diese Formel auf nanoskalige Ultraschallkontrastmittel anwenden (100 – 400 nm), müssten diese mit einer Frequenz von 8,25 – 33 MHz zum Schwingen angeregt werden.

Die auf dem Markt erhältlichen Ultraschallkontrastmittel sind von der amerikanischen Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln (Food and Drug Administration (FDA)) nur zur Darstellung des Herzens zugelassen ^{23, 24}. In Deutschland ist vor allem SonoVue® gebräuchlich, was bei der Echokardiographie, dem Doppler im Makrogefäßsystem und dem Doppler im Mikrogefäßsystem eingesetzt wird ²⁵.

1.3 NANOSKALIGE TRÄGERSYSTEME

1.3.1 LIPOSOMEN

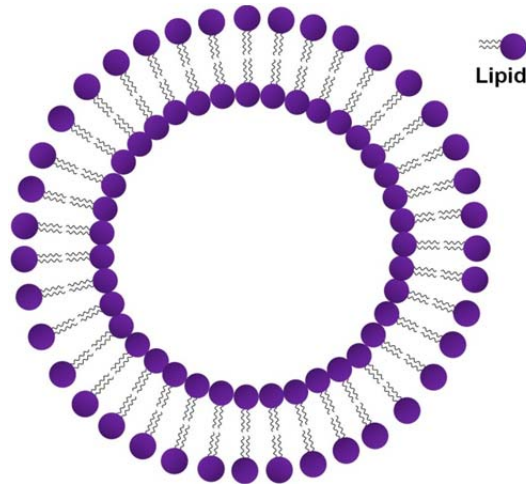


Abbildung 3: Schematische Zusammensetzung eines Liposoms.

Liposomen sind geschlossene Strukturen, die aus gekrümmten Lipiddoppelschichten bestehen und in ihrem Inneren einen Teil des Lösungsmittels einschließen, in dem sie frei schwimmen. Sie können aus einer (unilamellar) oder mehreren (multilamellar) konzentrischen Membranen aufgebaut sein. Die Größe schwankt zwischen 20 nm und mehreren Dutzend μm , während die Dicke der Membran bei ungefähr 4 nm liegt²⁶.

Liposomen sind aufgebaut aus amphiphilen Substanzen, d.h. aus oberflächenaktiven Molekülen. Diese Substanzen besitzen einen hydrophilen, wasserlöslichen und einen lipophilen, wasserunlöslichen Bereich, innerhalb eines Moleküls. Da diese Moleküle überwiegend in Wasser unlöslich sind, bilden sie kolloidale Dispersionen²⁶.

Die kugelförmigen Vesikel können mit polaren und unpolaren Substanzen beladen werden und besitzen die Fähigkeit verschiedene hydrophobe Barrieren zu überwinden oder die eingeschlossenen Substanzen in eine hydrophobe Umgebung oder durch andere Membranen

freisetzen. Diese Eigenschaften führten dazu, dass Liposomen in vielen Bereichen der Wissenschaft und Technologie eingesetzt werden, von Grundlagenforschung über bspw. Membranmechanismen oder Membranproteinfunktionen bis zu Wirkstofffreisetzungssystemen, Transfektionsvektoren oder auch in kosmetischen Zubereitungen. Liposomen können zum gezielten Targeting auch mit Antikörpern über bestimmte Anker-Lipide gekoppelt werden.²⁶

Zur Herstellung von Liposomen gibt es mehrere Methoden. In dieser Arbeit wurde die Filmmethode mit einigen Variationen verwendet.²⁶

Auf die genaue Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten liposomalen Formulierungen wird im Kapitel 2 (Methoden) eingegangen.

1.3.2 POLYMER-NANOPARTIKEL

Nanopartikel sind Partikel, die per Definition kleiner als 1 μm sind. Sie können aus einer Vielzahl verschiedener, bioabbaubarer und nicht-bioabbaubarer Polymere hergestellt werden. Auch für die Herstellung selbst gibt es viele verschiedene Methoden, dabei sind die Solvent Displacement²⁷, Emulsification Diffusion²⁸ und Salting-Out Methode²⁹ die wichtigsten.

In dieser Arbeit wurden PLGA-Nanopartikel hergestellt. PLGA (Poly(D,L-Lactid-co-Glykolid)) ist ein, von der FDA, zugelassenes, bioverträgliches und bioabbaubares Polymer³⁰. Dieses Polymer baut sich in Wasser durch chemische Hydrolyse der Esther-Verbindungen ab, was zur Bildung von Oligomeren mit Carboxylgruppen oder Milchsäure und Glykolsäure führt, welche über die Nieren ausgeschieden werden können³¹.

1.4 ARTERIOSKLEROSE

1.4.1 ENTSTEHUNG UND FOLGEERKRANKUNGEN DER ARTERIOSKLEROSE

Gemäß dem Statistischen Bundesamt Deutschland (DESTATIS) waren chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Herzinfarkt und Schlaganfall unter den sechs häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2010 ³². Arteriosklerose ist die zu Grunde liegende Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ³³.

Arteriosklerose ist eine degenerative Erkrankung der Blutgefäße, die zu einer Verengung und/oder Verhärtung der Arterien führt. Dieser pathologische Prozess beinhaltet eine fortschreitende Ausbreitung von Läsionen (Plaques), die schließlich zu einem Verschluss des Blutgefäßes führen können ³⁴.

Abbildung 4 stellt die Entwicklung einer arteriosklerotischen Plaque dar. Es geht eine endotheliale Fehlfunktion voraus, die im linken Bereich der Abbildung dargestellt ist. Beschädigungen am Endothel können bspw. durch Rauchen oder Diabetes verursacht werden und reduzieren die NO-Produktion. Lipoproteine niedriger Dichte (low density lipoproteins (LDL)) infiltrieren das Endothel und werden durch Makrophagen oxidiert. Wachstumsfaktoren und Zytokine werden freigesetzt und Adhäsionsmoleküle werden hochreguliert, was noch mehr Monozyten anlockt. Lipidbeladene Makrophagen wandeln sich in Schaumzellen um. Eine Anreicherung von Schaumzellen und die Proliferation von glatten Muskelzellen vergrößern die Plaque (s.a. mittleren Teil der Abbildung 4). Auf der rechten Seite der Abbildung ist der gefährliche Plaque-Typ zu sehen, der schließlich das Ergebnis von entzündlichem Zellinfiltrat, Tod der glatten Muskelzellen durch Apoptose und Matrixabbau durch Proteolyse durch Matrixmetalloproteasen (MMP), ist. Die gefährliche Plaque hat eine dünne fibröse Kappe und einen großen lipidreichen nekrotischen Kern. Reißt die dünne

1. EINLEITUNG

Kappe ein, kann es zu einer Thrombose kommen die letztlich zu einem kompletten Gefäßverschluss führt.

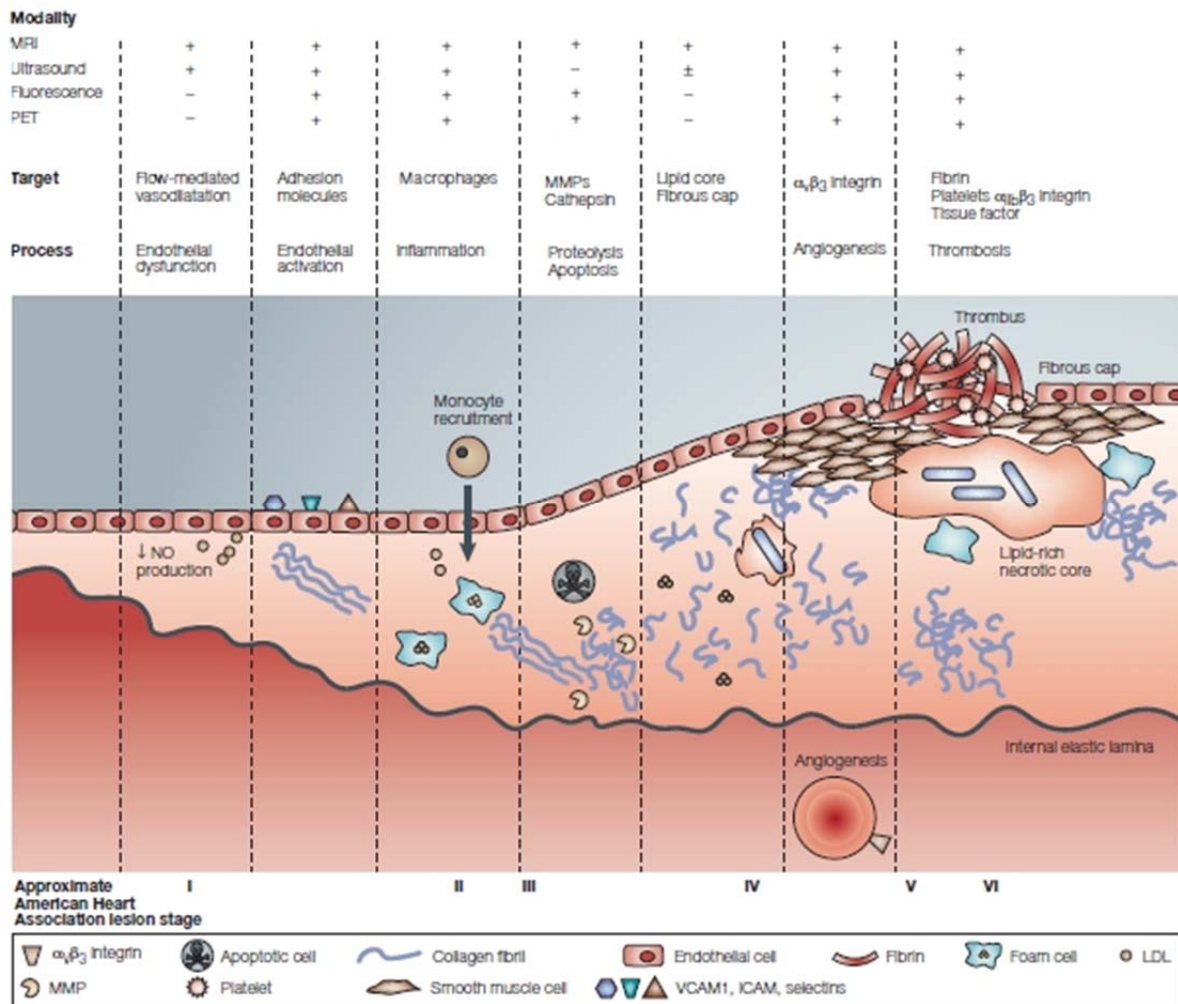


Abbildung 4: Entwicklung einer arteriosklerotischen Plaque. (Abbildung entnommen aus Referenz³⁵).

Abbildung 4 zeigt außerdem mögliche Zielstrukturen. Diese Zielstrukturen können spezielle Komponenten, wie beispielsweise Zelladhäsionsmoleküle, Makrophagen, Teile von Bindegewebe, Lipidkern und Fibrin, oder spezifische Prozesse, wie beispielsweise Apoptose, Proteolyse, Angiogenese und Thrombose sein. Die Symbole zeigen die Möglichkeiten der bildlichen Darstellung mit den aufgeführten Modalitäten (+ oder -)^{34,35}.

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre>graph TD; I((I)) --> II((II)); II --> III((III)); III --> IV((IV)); IV --> V((V)); IV --> VI((VI)); V --> VI; V --> IV; VI --> IV;</pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

Abbildung 5: Verschiedene Typen einer arteriosklerotischen Plaque (Übernommen aus Referenz³⁶).

Stary *et al.* teilten die arteriosklerotische Plaque in sechs verschiedene Kategorien ein. Arteriosklerose beginnt bereits im Kindesalter. Die sogenannten frühen Läsionen, Typ I und II, können ebenfalls bei Erwachsenen auftreten. Nach der Pubertät erscheint die Typ III Läsion und bildet einen Übergang zum Typ IV, der als fortgeschrittene Plaque klassifiziert wird und ab der dritten Dekade bei Erwachsenen beobachtet werden kann. Danach treten Typ V und VI in Erscheinung. Eine Typ V Läsion ist charakterisiert durch eine verdickte Intima mit fibrösen Gewebeschichten und wird unterteilt in Va (Fibroatherom), Vb (verkalkte Läsion) und Vc (fibröse Läsion). Bei Va sind Bindegewebsschichten in Kombination mit einem oder mehreren Lipidkernen vorhanden. Bei Vb ist die Läsion überwiegend verkalkt und

bei Vc charakterisiert durch fehlenden Lipidkern und wenig bis keine Verkalkung. Andere veröffentlichte Einteilungen sprechen nicht von Typ Va, Vb und Vc, sondern von Typ V, VII und VIII ³⁷⁻³⁹. Typ VI Läsionen weisen Oberflächendefekte, Hämatome und thrombotische Ablagerungen auf ³⁶.

Die verschiedenen Typen sollten nach ihren klinisch relevantesten Bereichen eingeteilt werden. Läsionen von Typ I bis IV schreiten hauptsächlich aufgrund von steigender Lipid-Ansammlung fort, haben keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser und den Blutfluss und sind meist klinisch unauffällig. Typ V Läsionen können unauffällig oder auffällig sein, abhängig vom Grad der Verengung und Typ VI Läsionen engen häufig das Lumen ein und sind daher meist klinisch auffällig. Im Flussdiagramm von Abbildung 5 ist zwischen Typ V und Typ VI eine Schleife eingezeichnet, die die Verdickung der Läsion durch Bildung thrombotischer Ablagerungen auf der Oberfläche symbolisiert. Diese Ablagerungen können sich wiederholt über unterschiedlich lange Zeitspannen im selben Bereich bilden und können in einer allmählichen Verengung des arteriellen Lumens resultieren ³⁶.

Komplikationen, die sich aus arteriosklerotischen Plaques ergeben können, sind Herzinfarkt, chronische, stabile Angina, Schlaganfall und periphere Gefäßerkrankung ³⁵.

1.4.2 IN VIVO DARSTELLUNG VON ARTERIOSKLEROTISCHEN PLAQUES

Zur Charakterisierung von arteriosklerotischen Plaques werden verschiedene nichtinvasive und auch invasive Methoden angewendet. Zu den nichtinvasiven Methoden zählen unter anderem Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT). Die MRT erlaubt eine Abbildung des Gefäßlumens und gleichzeitig liefert sie Informationen über die Gefäßwand und ermöglicht dadurch eine bessere und objektive Bestimmung der Gefäßwandmorphologie und Plaque Zusammensetzung auch ohne Kontrastmittel ^{40, 41}. Experimente mit Patienten, mit USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxide

nanoparticle; Eisenoxid-Nanopartikel, die mit Dextran mit niedrigem Molekulargewicht stabilisiert sind) als Kontrastmittel, mit einer Größe von 30 nm, konnten zeigen, dass USPIOs phagozytiert und überwiegend in Makrophagen angereichert werden, die sich in geplatzten oder bald platzenden Plaques befinden. Dies führte zu einer signifikanten Signalverstärkung bei MRT-Bildern ⁴². Auch computertomographische Untersuchungen können zur Charakterisierung von arteriosklerotischen Plaques verwendet werden, da beispielsweise in der Plaque enthaltenes Kalzium einen hellen Kontrast zeigt ⁴³. Aber auch bei der CT werden Kontrastmittel eingesetzt und deren Aufnahmefähigkeit durch Makrophagen, zur Lokalisierung der Plaques genutzt. Es wurden z.B. mit einem jodierten Aroyloxy-Ester modifizierte Polymer-Nanopartikel bei Kaninchen getestet ⁴⁴. MRT und CT zählen jedoch zu den teuersten Untersuchungsmethoden.

Eine weitere nichtinvasive und gleichzeitig sehr kostengünstige Methode zur Darstellung und Charakterisierung von Plaques ist Ultraschall. Hierbei kann zwischen weichem Gewebe und verkalktem Gewebe unterschieden werden, da unterschiedliche Gewebezusammensetzungen auch unterschiedliche Rückstreueigenschaften aufweisen ⁴⁵. Es wird auch intravaskulärer Ultraschall (IVUS) eingesetzt, welcher jedoch eine invasive Methode darstellt. Auch beim IVUS können verschiedene Plaque-Stadien anhand unterschiedlicher Rückstreuung unterschieden werden ⁴⁶. Sowohl bei der nichtinvasiven Ultraschalluntersuchung als auch beim IVUS können zur Verbesserung der Unterscheidung verschiedener Plaque-Stadien Kontrastmittel eingesetzt werden. Diese sind meist 1 – 8 µm große Gas-Bläschen mit Lipid ¹⁷-, Protein ⁴⁷- oder Polymer ⁴⁸-Hülle, die sehr gute Kontrastverstärkung aufweisen und zusätzlich passiv von Macrophagen in den Plaques aufgenommen ⁴⁹ werden oder auch aktiv modifiziert sein können ^{50,51}, um bestimmte Zielstrukturen von Plaques aufzuspüren.

KAPITEL 2: METHODEN

2. METHODEN

2.1 HERSTELLUNG UND PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON NANOSKALIGEN

ULTRASCHALLKONTRASTMITTELN UND POLYMER-NANOPARTIKELN

2.1.1 HERSTELLUNG

2.1.1.1 Nanoskalige Ultraschallkontrastmittel

Die zur Herstellung der liposomalen Ultraschallkontrastmittel verwendeten Lipide waren Cholesterol (CH) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) und 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DSPC) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland), sowie das Tensid Polyethylenglykol-(40)-Stearat (PEG40S) (Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in den molaren Verhältnissen DPPC/CH 70:30 mol%, DPPC/PEG40S 98:2 mol% und DSPC/PEG40S 98:2 mol%. Die Herstellung von Stammlösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml der genannten Lipide geschah durch Lösen der Lipide in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol 2:1 (Beide HPLC Qualität; Fisher Scientific, Loughborough, UK). Von diesen Stammlösungen wurden entsprechende Mengen entnommen, um eine Gesamt-Lipid-Konzentration von 5 oder 10 mg/ml zu erzielen, und in einem Rundkolben gemischt. Beim Abrotieren des Lösungsmittels bei 40 °C unter Vakuum (Heidolph Laborota 4000 efficient, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) entstand ein dünner Lipidfilm an der Gefäßwand des Rundkolbens. Dieser Film wurde mit 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4 (0,15 mol/l) gelöst und durch starkes Schütteln Filmreste entfernt. Anschließend erfolgte die Beschallung der Lipidmischungen in einem Ultraschall-Wasserbad (Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin

electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) bei 55 °C (DPPC/CH- und DPPC/PEG40S-Mischung) bzw. bei 65 °C (DSPC/PEG40S-Mischung) für 20 Sekunden. Nachdem die Lipidmischungen eine Stunde bei den oben genannten Temperaturen inkubiert wurden (ohne Beschallung), erfolgte eine erneute Beschallung der Suspensionen für weitere zwei Minuten.

Eine Variante zur Weiterbehandlung nach dem Inkubieren, war eine dreiminütige Beschallung im warmen Ultraschallbad, gefolgt von der Beschallung mit einem Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) (Sonotrode: MS72), für 30 Sekunden, bei maximaler Amplitude, mit Ultraschallpulsen (20%, d.h. während einer Sekunde wurde 0,2 Sekunden lang Schall abgegeben, und 0,8 Sekunden wurde kein Ultraschall abgegeben) dicht an der Flüssigkeitsoberfläche. Die Kolben wurden sofort in einem Becherglas, gefüllt mit Wasser (Raumtemperatur), abgekühlt.

Eine andere Variante war die anschließende Gefriertrocknung der Suspensionen (s. Kapitel 2.3.3).

Die Lagerung der Suspensionen bzw. Lyophilisate erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

2.1.1.2 Polymer-Nanopartikel

Zur Herstellung der Nanopartikel wurde Resomer 504H (Poly(D,L-Lactid-*co*-Glykolid) (PLGA)) (Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) verwendet. Die Herstellung der Partikel geschah mit der Aussalzmethode (salting-out method)²⁹. Bei dieser Methode mussten zunächst zwei Lösungen hergestellt werden. Die erste Lösung war wässrig und gelartig, bestehend aus dem wasserlöslichen Polymer Polyvinylalkohol (PVA) (Mowiol 4-88, Ter-Hell & Co GmbH, Hamburg, Deutschland) und einer hohen Menge Salz

(Magnesiumchloridhexahydrat $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Deutschland), gelöst in doppelt destilliertem Wasser. Die zweite Lösung war organisch und enthielt das Polymer PLGA gelöst in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel (Aceton). Unter kontinuierlichem Rühren mit einem Ultra-Turrax® (IKA Ultra-Turrax® T25 digital mit einem S25N–8G Dispergierwerkzeug, IKA, Staufen, Deutschland) wurde nun die wässrige, gelartige Lösung zur organischen Lösung gegeben. Dabei entstand zu Beginn, wenn noch wenig der wässrigen Lösung in der organischen Lösung vorhanden war, eine Wasser-in-Öl Emulsion (W/O) aufgrund des Aussalzeffektes, d.h. die hohe Salzkonzentration verhinderte eine Mischung des Acetons mit dem Wasser, obwohl Aceton in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar ist⁵². Die weitere Zugabe der wässrigen Lösung führte zu einer Phasenumwandlung und eine Öl-in-Wasser Emulsion (O/W) entstand. Anschließend wurde eine ausreichende Menge reinen, doppelt destillierten Wassers zu der O/W-Emulsion gegeben, ebenfalls unter Rühren, was die Diffusion des organischen Lösungsmittels in die Wasserphase erlaubte, da die Salzkonzentration so weit sank, dass Aceton in die wässrige Phase diffundieren konnte, was schließlich zur Bildung der Nanopartikel führte. Zum Schluss wurden die Nanopartikel durch Zentrifugieren gewaschen, der Überstand verworfen und die Nanopartikel in doppelt destilliertem Wasser resuspendiert.

Bei den vorliegenden Nanopartikeln bestand die wässrige Phase aus 3 % (w/w) PVA und 61 % (w/w) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, gelöst in doppelt destilliertem Wasser, und die organische Phase bestand aus 2,5 % (w/v) PLGA, gelöst in Aceton (Acros Organics, Geel, Belgien). Das Verhältnis von wässriger zu organischer Phase betrug 1:2. Die Rührgeschwindigkeit des Dispergier-Werkzeugs wurde auf 12000, 16000, 20000 oder 24000 rpm (Umdrehungen pro Minute) eingestellt und zwei Minuten konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit diente dazu, die Größe der Emulsionstropfen zu kontrollieren, welche in Zusammenhang mit der späteren Nanopartikelgröße steht⁵³. Nach der Zugabe von 2 ml reinem Wasser, wurde die

Emulsion ein weiteres Mal zwei Minuten lang gerührt, um die Nanopartikel zu bilden. Viermaliges Zentrifugieren (Hettich Mikro 120, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) der Nanopartikel-Suspension für je 15 Minuten, bei 14000 rpm, und waschen mit doppelt destilliertem Wasser entfernte PVA, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und Aceton. Die Lagerung der Nanopartikel erfolgte bei Raumtemperatur.

2.1.2 ANTIKÖRPER-KOPPLUNG

Damit die Antifibrin-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) für das Plaque-Targeting an die Kontrastmittel gebunden werden konnten, mussten Ankerlipide, auch Linkerlipide genannt, in die Lipid-Mischungen eingebracht werden. Für diese Experimente wurden die Ankerlipide 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Cyanur-(Polyethylenglycol)2000] (DSPE-PEG2000-CC) (Otto Nordwald GmbH, Hamburg, Deutschland) und 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Cyanur) (DPPE-CC) (Synthetisiert in unserem Labor nach Bendas *et al.* ⁵⁴) in Kombination mit 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DSPC) (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland) und Polyethylenglycol-(40)-Stearat (PEG40S) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Substanzen wurden in den Verhältnissen DSPC/PEG40S/DPPE-CC 91:9:10 mol% und DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC 91:9:10 mol% gemischt.

Die Herstellung der liposomalen Ultraschallkontrastmittel erfolgte zunächst, wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Von vorbereiteten Stammlösungen (10 mg/ml) wurden entsprechende Mengen entnommen, um eine Gesamt-Lipid-Konzentration von 5 mg/ml zu erzielen, und in einem Rundkolben gemischt. Beim Abrotieren des Lösungsmittels bei 40 °C unter Vakuum entstand ein dünner Lipidfilm an der Gefäßwand des Rundkolbens. Dieser Film wurde mit 1 ml Boratpuffer pH 8,8 (0,1 M) gelöst und unter starkem Schütteln Filmreste entfernt, gefolgt von der Beschallung der Lipidmischungen in einem Ultraschall-Wasserbad

(Bandelin Sonorex RK 100H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) bei 65 °C für 20 Sekunden. Nach einer einstündigen Inkubation der Lipidmischungen, bei der oben genannten Temperatur (ohne Beschallung), erfolgte eine weitere dreiminütige Beschallung der Suspensionen, um mögliche Aggregate zu lösen. Zum Schluss wurden die Lipidmischungen mit einem Ultraschallstab (Bandelin Sonoplus HD 3100, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) (Sonotrode: MS72) 30 Sekunden lang bei maximaler Amplitude mit Ultraschallpulsen (20 %) dicht an der Flüssigkeitsoberfläche beschallt und die Kolben sofort in einem Becherglas, gefüllt mit Wasser (Raumtemperatur), abgekühlt.

Die Ankerlipide DPPE-CC und DSPE-PEG2000-CC erlaubten eine Antikörper-Kopplung, ohne dass vorherige Aktivierungsschritte der Lipide oder des Antikörpers nötig waren^{55, 56}. Monoklonale Antifibrin-Antikörper wurden in Boratpuffer pH 8,8 gegeben, zu den Lipid-Suspensionen in einem molaren Verhältnis 4000:1 (Ankerlipid:Antikörper) hinzugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem molaren Verhältnis ging man davon aus, dass der Antikörper komplett mit den Linkerlipiden reagiert.

Cyanurchlorid besitzt drei funktionelle Bereiche und verknüpfte die Antikörper mittels nukleophiler Substitution im basischen pH-Bereich⁵⁴. Die nukleophile Substitution der Chloratome, mit primären oder sekundären Aminen, in Gegenwart eines Salzsäure-Akzeptors (organische oder anorganische Base), kann durch die Temperatur kontrolliert werden und läuft innerhalb desselben Reaktionsgefäßes ab. Die erste Substitution an Cyanurchlorid erfolgt innerhalb von Minuten bei 0 °C, während die zweite Substitution innerhalb von 12 - 24 Stunden bei Raumtemperatur auftritt und die dritte und letzte Substitution tritt typischerweise innerhalb 12-24 Stunden auf, benötigt aber Temperaturen über 60 °C⁵⁷. Bendas *et al.*⁵⁴ nutzten diese Eigenschaften von Cyanurchlorid und inkubierten monoklonale

Antikörper in Boratpuffer mit pH 8,8 über Nacht bei Raumtemperatur. Dabei knüpfte der Antikörper an das zweite Chloridatom, während das dritte frei blieb ⁵⁶.

Es gibt eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten, Antikörper an die Oberfläche von Liposomen zu binden. Mit der oben erwähnten Cyanurchlorid-Gruppe oder einer Glutaryl-Gruppe können Antikörper direkt, ohne vorherige Aktivierung, an Liposomen gebunden werden. Bei anderen Verknüpfungsformen, müssen die Antikörper oder die Linkerlipide (Ankerlipide) vorher beispielsweise über Thiol-Gruppen aktiviert werden, oder die Linkerlipide müssen mit Carbonyl-Gruppen modifiziert werden, um mit der Amin-Gruppe des Antikörpers zu reagieren. Es gibt noch viele weitere Möglichkeiten, die im Review von Manjappa *et al.* ausführlich beschrieben sind ⁵⁶.

Die Antifibrin-Antikörper wurden nach der Methode von Bendas *et al.* ⁵⁴ an die Liposomen kovalent, über amin-reaktive Cyanurgruppen, entweder direkt an die Oberfläche der Liposomen, mit Cyanurchlorid-aktiviertem DPPE (DPPE-CC) (s.a. Abbildung 6), oder weiter von der Oberfläche entfernt, an die distalen Enden von PEG-Spacern, mit aktivierten Cyanur-PEG-DSPE (DSPE-PEG2000-CC) (s.a. Abbildung 7), gebunden. Dies ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

Ein Teil der Suspensionen wurde entnommen und gefriergetrocknet und der andere Teil unverändert weiter verwendet. Die Lagerung der Suspensionen (gefriergetrocknet und nicht gefriergetrocknet) erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

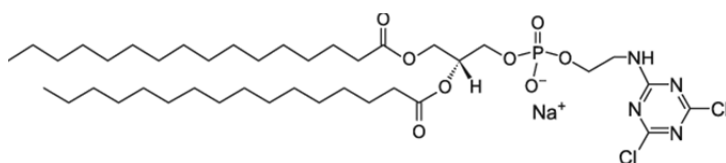


Abbildung 6: DPPE-CC

(Quelle:

http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1967&Itemid=183&catnumber=870287)

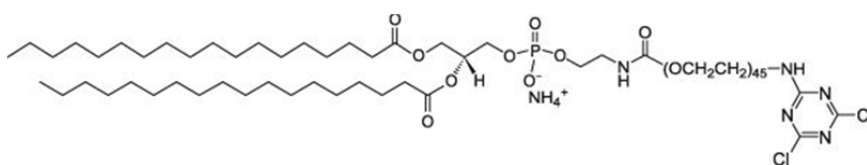


Abbildung 7: DSPE-PEG2000-CC

(Quelle:

http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=1961&Itemid=153&catnumber=880122)

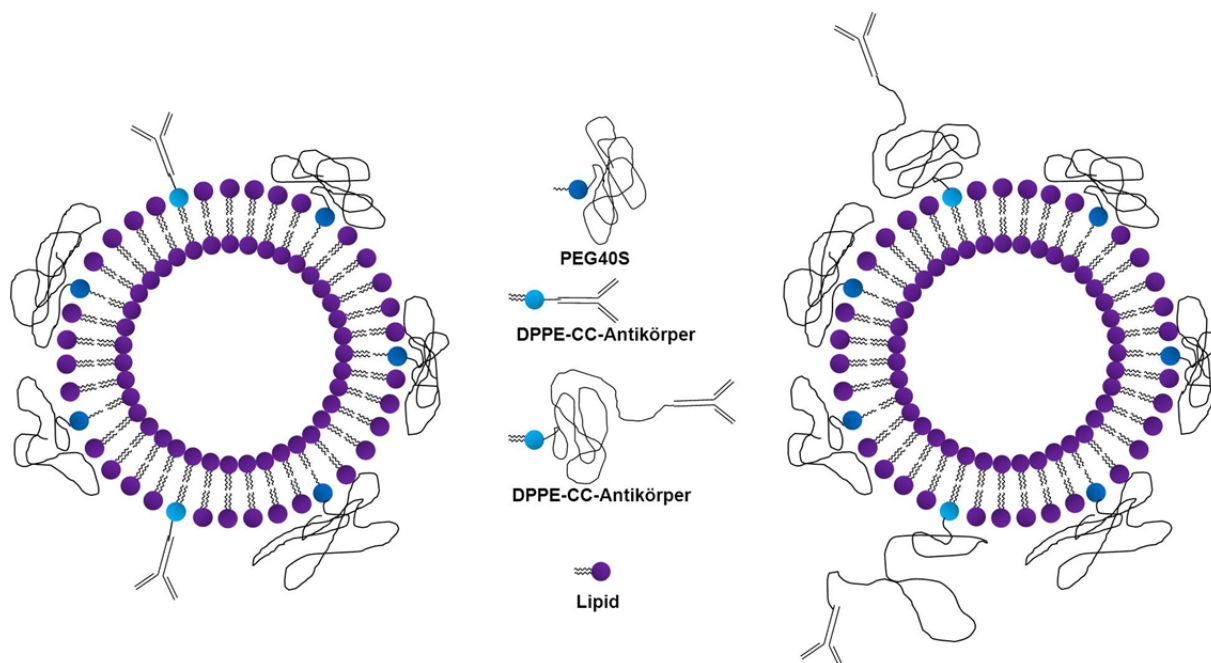


Abbildung 8: Antikörper entweder direkt an die Liposomen-Oberfläche gekoppelt (links) oder via Spacer etwas weiter weg von der Oberfläche (rechts).

2.1.3 GRÖÖE UND ZETAPOTENTIAL

Die Größe und das Zetapotential der verschiedenen Formulierungen wurden mithilfe eines Zetasizer von Malvern (Nano ZS, Herrenberg, Deutschland) ermittelt.

Das bei der *Größenmessung* mit dem Zetasizer zugrunde liegende Messverfahren ist die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Dabei handelt es sich um ein dynamisches Streulichtverfahren, mit dem Teilchen im Bereich von ca. 5 nm bis ca. 5 µm detektiert werden können. Die Intensität der gestreuten Lichtstrahlen wird winkelabhängig erfasst. In der Regel wird das Streulicht in einem Winkel von 90° gemessen. Beim Zetasizer Nano ZS wird jedoch ein Winkel von 173 °C verwendet. Die Blende für den Laser und die Messposition werden automatisch von der Malvern Software eingestellt. Die Lichtquelle stellt ein 10 mW He-Ne-Laser, mit einer Wellenlänge von 633 nm, dar. Die Teilchen unterliegen der Brownschen Molekularbewegung, was zu zeitabhängigen Schwankungen in der gemessenen Intensität des Streulichts führt. Die zeitlichen Änderungen der Intensität sind somit größenabhängig, da kleinere Teilchen eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen als größere. Anhand einer Autokorrelationsfunktion kann anschließend die mittlere Teilchengröße bestimmt werden. Als Messergebnis kann man, neben dem mittleren Teilchendurchmesser und dem Polydispersitätsindex (Pdi) auch eine Teilchengrößenverteilung berechnen lassen. Ein Pdi von < 0,2 zeigt eine monomodale Verteilung an, ein Pdi von 0,2 bis 0,5 zeigt eine multimodale Verteilung an⁵⁸. Die Ergebnisse jeder Probe wurden als Z-Ave (ein vom Gerät ermittelter Durchschnittswert) dargestellt, ermittelt aus je dreimal mindestens zehn Messungen. Die Messwerte wurden aus mindestens drei unabhängigen Proben berechnet und die Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

Bei einem Pdi, der größer als 0,5 ist, ist es eigentlich nicht sinnvoll die Partikelgröße als Z-Ave anzugeben, da dieser hierbei nicht der tatsächlichen Partikelgröße entspricht. Der Z-Ave wird vom Messgerät aus der Intensität der Lichtstreuung errechnet. Bei einem zu großen Pdi,

wie er auch bei den liposomalen Formulierungen vorlag, sollte man sich die einzelnen Peaks genauer ansehen⁵⁹. Dennoch sind im Folgenden alle Größen als Z-Ave angegeben, da die Auswertung von einzelnen Peaks ebenfalls nicht eindeutig möglich war.

Das bei der Messung des *Zetapotentials* zugrunde liegende Messverfahren ist die Laser-Doppler-Anemometrie (LDA). Bei diesem Verfahren wird die elektrophoretische Beweglichkeit der Teilchen bei einem Streuwinkel des Lasers von 17° gemessen. Dieser Streuwinkel verursacht eine schwankende Signalstärke, wobei die Schwankung proportional zur Geschwindigkeit der Partikel ist. Ein digitaler Signalprozessor extrahiert die charakteristischen Frequenzen aus dem Streulicht⁵⁹. Jede Probe wurde dreimal mit je zehn Läufen gemessen. Die Messwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Proben angegeben.

Ultraschallkontrastmittel:

10 μ l der liposomalen Formulierung wurden mit 990 μ l doppelt destilliertem Wasser verdünnt, in eine spezielle Plastik-Küvette gefüllt und vermessen.

Polymer-NPs:

Die Nanopartikelsuspension wurden vor den Messungen 1:10 mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt und in eine spezielle Plastik-Küvette gefüllt und vermessen.

2.1.4 MORPHOLOGIE

2.1.4.1 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (AFM (atomic force microscope)) wird i.d.R. dazu genutzt, die Topografie einer Probe unter Normalbedingungen oder in Flüssigkeit darzustellen. Eine feine, an einem Cantilever befestigte Spitze (Kurvaturradius 10 nm) tastet die Oberfläche ab und aus der Verbiegung dieses Cantilevers, welche mit einem Laser erfasst wird, wird ein Bild der Oberfläche erzeugt. Dabei ist es möglich auch sehr weiche Materialien zu untersuchen, da nur äußerst geringe Kräfte auf die Probe ausgeübt werden^{60, 61}.

Bei den Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop wurden 20 µl der Probe auf einen Silicon-Chip gegeben und trocknen lassen. Die Messungen erfolgten mit einem Vibrationsgedämpften Nanoscope IV Bioscope (Veeco Instruments, Mannheim, Deutschland) und kommerziell erhältlichen, pyramidalen Si₃N₄-Spitzen (NSC16/AlBS, MikroMasch, Estland) auf einem Cantilever (Länge 230 µm, Resonanzfrequenz 170 kHz und nominale Kraftkonstante 40 N/m). Die Verwendung des tapping modeTM ermöglichte es, Beschädigungen der Probe minimal zu halten. Die Messgeschwindigkeit wurde proportional zur Größe des Messbereichs gewählt und die Frequenz lag zwischen 0,5 und 1,5 Hz. Die bildliche Darstellung der Ergebnisse erfolgte im Amplituden- bzw. im Höhen-Modus, wobei die jeweiligen Signale gleichzeitig aufgenommen wurden. Die Bestimmung der Partikeldurchmesser (± Standardabweichung) erfolgte durch Vermessung von je 40 einzelnen Partikeln auf einer Fläche von 5 x 5 µm mit fünf verschiedenen Proben.

2.1.4.2 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) könnte man als ein umgekehrtes Lichtmikroskop bezeichnen, bei dem die Probe von einem Elektronenstrahl beleuchtet wird. Am oberen Ende der Mikroskop-Säule befindet sich eine Elektronenkanone – ein System von elektromagnetischen Linsen fokussiert den Elektronenstrahl auf die Probe. Übertragene Elektronen werden auf einen Bildschirm oder ein fotografisches oder digitales Aufnahmegerät projiziert. Diese Messung muss unter Vakuum durchgeführt werden, da beispielsweise Gasmoleküle die Elektronen leicht ablenken. Es können nur sehr dünne Probenschnitte untersucht werden, da Elektronen Materie nur schlecht durchdringen. Bei der Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Cryo-TEM) wird die Probe zusätzlich im tiefgefrorenen Zustand bildlich dargestellt ⁶².

Für die Untersuchungen im Cryo-TEM wurden die Proben unverdünnt verwendet. Die Vorbereitung von speziellen Probenhaltern (Quantifoil® S7/2 Cu 400 mesh, holy carbon film grids (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Deutschland)) erfolgte entsprechend einer Standardvorschrift ⁶³. Nach dem aufgeben eines Tropfens der Probe auf das Grid, wurde der größte Teil der Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Dabei blieb ein dünner Film zurück, der sich über die Vertiefungen spannte. Durch Eintauchen in flüssiges Ethan wurden die Proben schockgefroren und anschließend mit flüssigem Stickstoff auf 90 K abgekühlt. Anschließend wurden die Proben, wie oben beschrieben ⁶⁴, auf das Mikroskop (Leo 912 Omega, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland) übertragen und bei annähernd 100 K untersucht.

2.1.4.3 Phosphat-31-Kernspinresonanzspektroskopie

Bei der Aufnahme eines Kernspinresonanzspektrums (NMR-Spektrum), wird in einem Hochfrequenzgenerator elektromagnetische Strahlung konstanter Frequenz erzeugt und die Feldstärke des äußeren Feldes kontinuierlich geändert bis Resonanz erfolgt. Der Energieverlust durch die Resonanz wird als Absorptionspeak registriert. Die wichtigsten Kerne für die NMR-Spektroskopie sind 1H , ^{19}F , ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si , ^{14}N , und ^{14}B ⁶⁵. Phosphor-31 zeigt scharfe NMR-Signale, die einen Bereich von 700 ppm abdecken. Die Resonanzfrequenz des ^{31}P -Kerns beträgt 81,0 MHz bei 4,7 T ⁶⁶.

Phosphat-31-Kernspinresonanzspektroskop-Untersuchungen (^{31}P -NMR (phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy)) wurden in D_2O bei 50 ppm Spektralbreite und einer Resonanzfrequenz von 202,47 MHz (11,7 T) mit einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL GmbH, Eching, Deutschland) durchgeführt und je 1000 Messungen, bei Verwendung von 4,5 μs Pulsen, gesammelt. Vor der Fourier-Transformation (Umwandlung der Signale in ein Spektrum) wurde eine Linienverbreiterung von 30 Hz durchgeführt. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (25 °C).

2.2 ULTRASCHALLAKTIVITÄT

2.2.1 AUFBAU DES FLUSSMODELLS

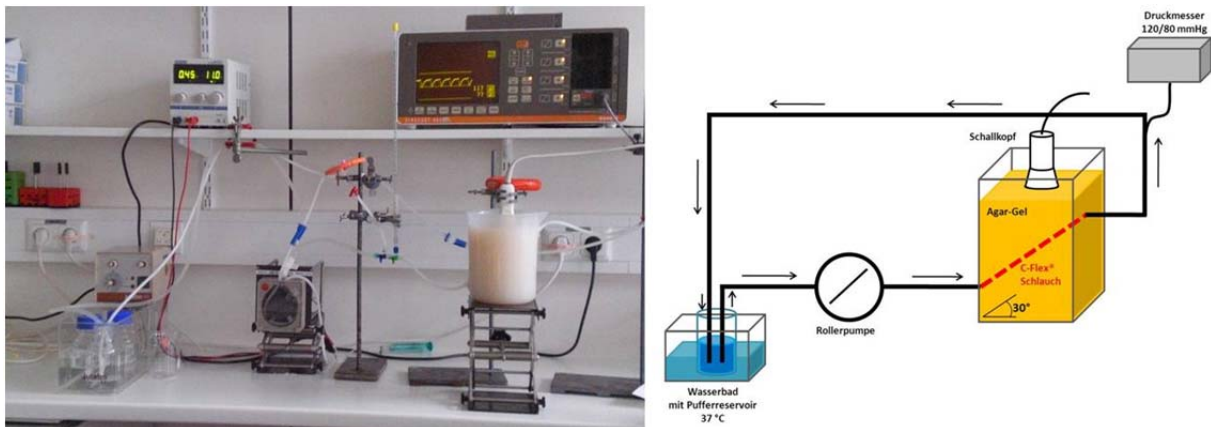


Abbildung 9: Flussmodell. Links: Foto des tatsächlichen Aufbaus; rechts: Schematische Zeichnung.

Um die Ultraschallkontrastverstärkung der hergestellten liposomalen Formulierungen ermitteln zu können, wurde ein *in vitro* Flussmodell, nach dem Vorbild eines Testobjektes, zur apparativen Qualitätssicherung bei Ultraschall-Doppler-Geräten, aufgebaut ⁶⁷ (s.a. Abbildung 9). Der für die Messungen entscheidende Teil, in diesem Modell, war der mit Agar-Gel gefüllte Becher. Das Gel bestand aus 3 % Agar, 85,5 % doppelt destilliertem Wasser, 11 % Glycerol und 0,5 % Natriumazid als Biozid. In das Gel war ein sogenannter C-Flex® Schlauch (Cole Parmer Inc., Illinois, USA) in einem Winkel von 30 °C eingebettet. Das Agar-Gel wies sehr ähnliche Ultraschalleigenschaften wie menschliches Gewebe auf und der spezielle Schlauch war vergleichbar mit Blutgefäßen. Eine Rollerpumpe stellte einen konstanten Fluss des Mediums her und der Druck konnte auf einen mittleren Druck von 120/80 mmHg eingestellt und mit Hilfe des Manometers auch überprüft werden. Als Medium wurde ein Tris-Albumin-Puffer (0,15 mol/L Natriumchlorid, 0,002 mol/L 2-Amino-2-

Hydroxymethylprpan-1,3-diol-hydrochlorid (Tris-HCL) und 0,1 % Bovines Serum Albumin (BSA)) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Der Puffer durchlief das Schlauchsystem mit einer Temperatur von 37 °C, welche mit Hilfe eines Wasserbades eingestellt wurde. Im Reservoir befanden sich 150 ml Puffer, im gesamten Schlauchsystem 50 ml, was einem Gesamtvolumen von 200 ml entsprach.

Die Vermessung von gleichen Mengen der neuen liposomalen Ultraschallkontrastmittel und dem käuflichen SonoVue ®, erlaubte einen Vergleich der Kontrastintensitäten zwischen den neuen, nanoskaligen Formulierungen mit der bereits bekannten Formulierung, die Mikrobläschen enthält.

2.2.2 MESSUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES

Die Bestimmung des Ultraschallkontrastes geschah mit einem Ultraschallgerät (SONOLINE Elegra, Siemens, Erlangen, Germany), welches mit einem 2,5 MHz Phased Array Schallkopf bestückt war. Der Schallkopf wurde auf der Agar-Gel-Oberfläche des Flussmodells platziert und der Schallstrahl auf den C-Flex ® Schlauch gerichtet. Der Schallkopf besaß eine axiale Auflösung von 0,7 mm. Die laterale Auflösung hängt von der Breite des Ultraschallstrahls ab und lag näherungsweise bei 3 mm. Die Eindringtiefe wurde auf 10 cm eingestellt, der Dynamische Bereich war 40 dB und die Ultraschallfrequenz lag bei 1,4 Mhz. Der Mechanische Index war 0,4, um eine nichtlineare Schwingung der Bläschen und damit eine harmonische Schwingung der Fundamentalfrequenz in den Formulierungen zu erreichen. Mit Hilfe der phasenumgekehrten, harmonischen Bildgebung konnten die harmonischen Frequenzen empfangen werden. In Zeitabständen von 0,5 Sekunden wurden Ultraschallbilder aufgenommen. Das Probenvolumen betrug 200 µl.

2.2.3 AUSWERTUNG DER ULTRASCHALLBILDER

Die Speicherung der vom Ultraschallgerät aufgezeichneten Bilder erfolgte auf einer magnetooptischen Diskette (MO-Disc (magneto optical disc)) als 8-Bit-Graustufen-Bilder in einem DICOM-Format.

Die Kontrastintensitäten wurden als mittlere Grauwerte mit der Software ImageJ 1.42q (National Institute of Health, Bethesda (Maryland), USA) berechnet. Dabei erzeugte eine Makro in jedem Bild das gleiche Rechteck (region of interest (ROI)), von dessen Fläche die Software den mittleren Grauwert ermittelte. Eine Umrechnung in Prozent bezogen auf den mittleren Grauwert von SonoVue®, welcher 100% entspricht, ermöglichte den Vergleich der Kontrastintensitäten der verschiedenen Formulierungen. Für jede liposomale Formulierung wurden 10 bis 20 Bilder analysiert. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der Grauwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Proben.

2.3 VERBESSERUNGEN DES ULTRASCHALLKONTRASTES

Nachdem schon gleich zu Beginn Lipidmischungen gefunden worden waren, die eine sehr starke Ultraschallkontrastverstärkung zeigten, wurden weitere Experimente durchgeführt, um heraus zu finden, ob andere Lipidmischungen oder auch Variationen bei der Herstellung einen weiteren positiven Einfluss auf die Ultraschallkontrastverstärkung haben können.

2.3.1 VARIATION DER LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Die bisher verwendeten Lipide waren DPPC und DSPC. Dies sind Phosphatidylcholine mit 16 bzw. 18 C-Atomen in den Ketten. DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin) mit 14 C-Atomen, sollte als weiteres Phosphatidylcholin in Kombination mit PEG40S getestet werden.

Um weitere „Dipalmitoyle“ zu untersuchen, wurde neben DPPC noch DPPE (1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin) und DPPG (1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phospho-(1'-rac-Glycerol) in Kombination mit PEG40S getestet.

DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan), als kationisches Lipid, wurde in Kombination mit PEG40S untersucht, sowie eine Beimischung von DPPE zu DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S.

2.3.2 VARIATION DER HERSTELLUNGSMETHODE

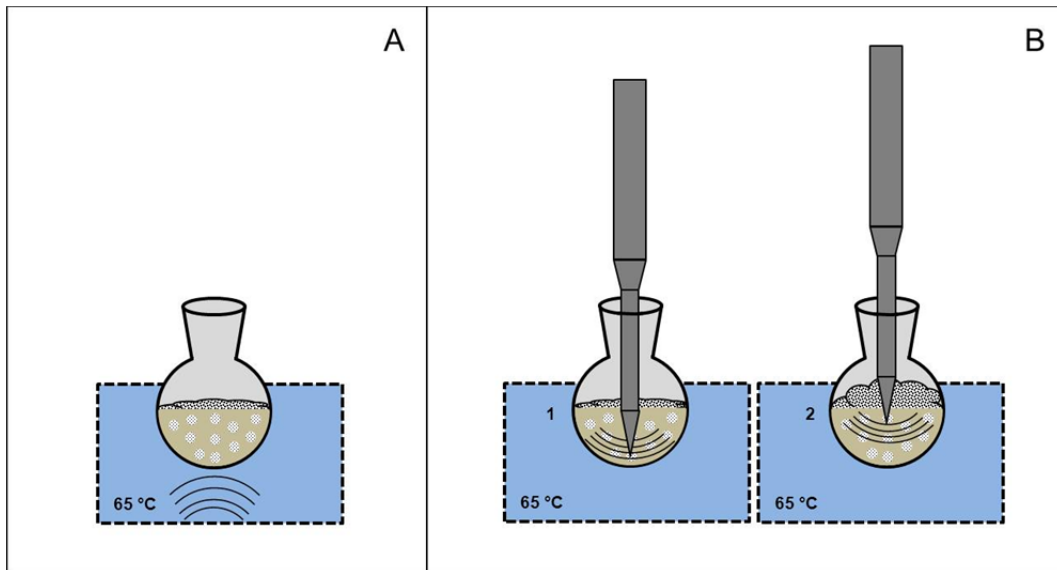


Abbildung 10: Variation bei der Herstellung . (A) Ultraschallbad, (B) Ultraschallstab.

Um den Einfluss der Herstellungsmethode auf die Ultraschallkontrastverstärkung zu untersuchen, erfolgten Experimente mit Ultraschallbad und Ultraschallstab.

Die Herstellung der Lipidmischungen verlief zunächst wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben. Nach der einstündigen Inkubation der Mischungen bei 65 °C im Ultraschallwasserbad, erfolgte eine Beschallung entweder (A) mit dem Ultraschallbad bei 65 °C für 1, 2, 3, 4 oder 5 Minuten oder (B) bei 65 °C mit dem Ultraschallstab für drei Minuten nahe am Boden des Kolbens mit 10, 30 oder 50 % Amplitude und konstantem Ultraschall (1) und anschließend für 10, 20, 30 oder 40 Sekunden bei 30, 60 oder 97 % Amplitude (97 % Amplitude ist die maximal zulässige Amplitude bei der MS72-Spitze) und mit Ultraschallpulsen (20 %) nahe an der Flüssigkeitsoberfläche (2) (s.a. Abbildung 10).

Davon wurde jeweils ein Teil entnommen und lyophilisiert, und der andere Teil unverändert vermessen.

2.3.3 GEFRIERTROCKNEN

Um den Einfluss des Gefriertrocknens auf den Ultraschallkontrast zu untersuchen, wurde von jeder Formulierung eine bestimmte Menge entnommen und gefriergetrocknet. Bei den DPPC/CH-Mischungen schützte ein Cryoprotektor (0,2 M Lösung von Mannitol (1:1) oder mit 5 % PEG4000) die Formulierungen während des Gefriertrocknens. Bei den PEG40S-haltigen Formulierungen war eine solche Schutzsubstanz nicht nötig, weil die enthaltenen PEG-Ketten bereits ausreichenden Schutz bieten sollten, ähnlich wie in der bekannten Schutzsubstanz PEG4000.

Anschließend wurden Größe und Zetapotential sowie der Ultraschallkontrast bestimmt.

2.3.4 MESSUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES

Die Ultraschallmessung erfolgte mit einem eZono 3000 (eZono AG, Jena Deutschland), welches mit einer 3,5 MHz Konvex Sonde bestückt war. Der Schallkopf wurde auf der Agar-Gel-Oberfläche des Flussmodells platziert und der Schallstrahl auf den C-Flex® Schlauch gerichtet. Bei den zur Messung vorliegenden Einstellungen betrug der MI 0,7, die axiale Auflösung ~0,5 mm und die laterale Auflösung ~3 mm. Die Eindringtiefe war 9 cm und die verwendete Ultraschallfrequenz 2,85 MHz. Aus den aufgezeichneten Videos wurden je zehn Bilder im PNG-Format abgespeichert. Das Probenvolumen betrug 100 µl. Die Größe des Reservoirs betrug 100 ml.

2.3.5 AUSWERTUNG DER ULTRASCHALLBILDER

Die Auswertung der Ultraschallbilder erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 mit der Software ImageJ 1.42q (National Institute of Health, Bethesda (Maryland), USA) und einer Makro, die in jedem Bild das gleiche ROI erzeugte. Eine Umrechnung in Prozent bezogen auf den mittleren

2. METHODEN

Grauwert von SonoVue®, welcher 100% entspricht, ermöglichte den Vergleich der Kontrastintensitäten der verschiedenen Formulierungen. Für jede liposomale Formulierung wurden zehn Bilder analysiert. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten der Grauwerte \pm Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Proben.

2.4 MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN

Es sollten die elastischen Eigenschaften der liposomalen Formulierungen untersucht werden, um festzustellen, ob diese an der Entstehung des Ultraschallkontrastes beteiligt sind. Als Modell zur Validierung dieses Experiments wurden zunächst Polymer-Nanopartikel hergestellt und deren elastischen Eigenschaften mit dem Rasterkraftmikroskop vermessen und ausgewertet.

2.4.1 GRUNDLAGEN ZUM RASTERKRAFTMIKROSKOP UND KRAFTMESSUNGEN

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) ist gut dazu geeignet, auch sehr weiche Materialien abzubilden, da kleinste Kräfte, bis in den Pico-Newton (pN) Bereich, angelegt werden können⁶⁰. Zusätzlich bietet das Gerät die Möglichkeit mechanische Eigenschaften von Nanomaterialien, wie PLGA Nanopartikeln, zu bestimmen. Anhand von Kraft-Distanz-Kurven kann das Young Modul, E , des Materials ermittelt werden. Das Young Modul, oder auch Elastizitätsmodul, ist eine Konstante für ein vorliegendes Material und stellt die mechanische Belastbarkeit eines Materials während Dehnung oder Stauchung dar. Das Young Modul ist dabei unabhängig von der Art der Deformierung^{68, 69}.

Die Berechnung des Young Moduls erfolgt mit dem Hertz Model von Sneddon⁷⁰. Hertz veröffentlichte 1881 die grundlegenden Prinzipien der Berührung fester, elastischer Körper und beschrieb analytisch die elastische Verformung beim Zusammenstoß zweier homogener, kugelförmiger Oberflächen⁷¹. Sneddon erweiterte dieses Modell auf andere geometrische Formen, wie beispielsweise das Eindringen eines Konus oder eines Paraboloids in einen elastischen Halbraum⁷².

Die Kraftkurven, die mit dem AFM dargestellt werden, sind zunächst Grafen, in denen die Spannung, die an den Piezo angelegt wird, gegen die Spannung, die an der Diode ankommt, die wiederum die Cantilever Verbiegung anzeigt, aufgetragen wird. Um diese in die besser bekannten Kraft-Distanz-Kurven umzuwandeln, werden vor den Messungen Kalibrierungen des Cantilevers durchgeführt. Die „deflection sensitivity“ wandelt die Spannung in die Cantilever Verbiegung um und die Federkonstante des Cantilevers wird umgewandelt in die angelegte Kraft⁷³. Die Eindringtiefe sollte maximal 10 % der Materialdicke betragen, um Substrat-Einflüsse zu vermeiden^{70, 73}.

Für die Kraftmessungen wurden kommerzielle Cantilever benutzt (CSC37/noAl, MikroMasch, Tallinn, Estland). Der Silikon-Chip der CSC37-Serie beinhaltet drei rechteckige Cantilever (A, B und C), die sich in Länge, Resonanzfrequenz und Kraftkonstante unterscheiden. Für die folgenden Messungen wurde der Cantilever B mit einer Länge von 350-5 μm , einer Breite von $35 \pm 3 \mu\text{m}$, einer typischen Dicke von 2 μm , einer Resonanzfrequenz von 21 kHz (17 – 24 kHz) und einer Kraftkonstante von 0,3 N/m (0,1-0,4 N/m) ausgewählt (s. Herstellerangaben). Laut Herstellerangaben lag der Radius der Krümmung bei weniger als 10 nm und der Konuswinkel der Spitze war kleiner als 30°. Um die tatsächliche Federkonstante des Cantilevers zu bestimmen, musste dieser auf einer Glasoberfläche an Luft mit dem geräteeigenen „calibration manager“ kalibriert werden. Dies ist wichtig, da die Federkonstante Teil der Berechnungen des Elastizitätsmoduls der Nanopartikel ist.

Mit Hilfe solcher Nanoeindruckexperimente können wertvolle Informationen über lokale Materialeigenschaften, wie Elastizität, Härte, Adhäsion und Oberflächenladungsdichte ermittelt werden⁷⁰.

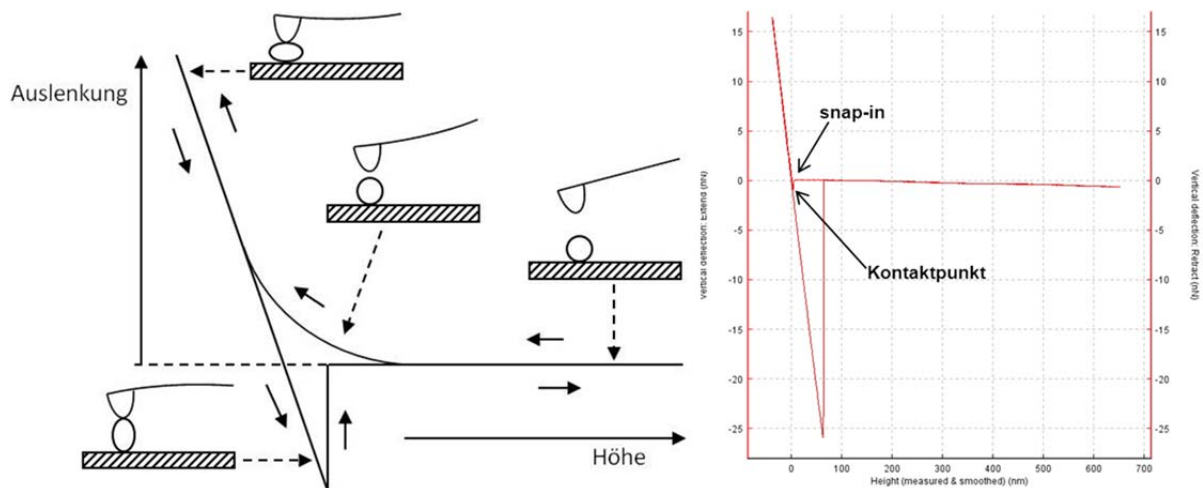


Abbildung 11: Typische Kraftkurve einer Kraftmessung mit dem AFM. Links: schematische Darstellung der Annäherung der AFM-Spitze an einen Partikel. Rechts: Kraftkurve gemessen auf einem Nanopartikel.

In Abbildung 11 ist eine Kraftkurve exemplarisch dargestellt. Links im Bild ist schematisch die Annäherung einer AFM-Spitze an einen Partikel dargestellt und rechts im Bild eine Kraftkurve, die auf einem Nanopartikel gemessen wurde. Von rechts nach links nähert sich die AFM-Spitze an die Partikeloberfläche an. Kurz vor dem Berührungspunkt gibt es oft einen sog. snap-in, bei dem sich die Spitze plötzlich noch etwas weiter hin zur Oberfläche verbiegt, und erst dann kommt es zum Kontakt mit der Partikeloberfläche. Ab diesem Zeitpunkt wird die weitere Annäherung der Spitze als ansteigende Gerade dargestellt, weil der Cantilever durch die Wechselwirkung mit dem Material verbogen wird. Auf dem Rückweg, fällt die Gerade wieder ab und wird weiter fortgesetzt als zuvor, da die Spitze nun, durch Adhäsionskräfte, an der Oberfläche der Partikel haftet. Diese Kräfte reißen abrupt ab, die Spitze schnell in die Ausgangslage zurück und bewegt sich weiter in Richtung Ausgangsposition ohne nochmals ausgelenkt zu werden.

Der Elastizitätsmodus oder Young Modul kann nach dem Gesetz von Hook:

$$F = k_c * d$$

(F ist die Kraft, k die Federkonstante des Cantilevers und d die Auslenkung des Cantilevers), sowie mit dem komplexen Hertzmodell nach Sneddon berechnet werden ⁷⁰:

$$F = \frac{4}{3} * \frac{E}{(1 - \nu^2)} * \delta^{\frac{3}{2}} * \sqrt{R}$$

Hierbei ist F die Kraft, E das Young Modul, R der Radius der Spitze, δ die Eindringtiefe und ν die Poisson-Zahl (Querkontraktionszahl).

Die Ablenkung des Cantilevers kann mit Hilfe der Steigung der Kraftkurve berechnet werden. Nach der Bestimmung der angelegten Kraft kann das Young Modul oder E-Modul der Nanopartikel, mittels der genannten Formeln des Hertzmodells nach Sneddon, für das Paraboloid berechnet werden.

2.4.2 DURCHFÜHRUNG DER KRAFTMESSUNGEN

Zunächst wurde die CSC-Spitze, wie in Kapitel 2.4.1 auf einer reinen Glasoberfläche kalibriert und die Federkonstante ermittelt. Die Kraftmessungen selbst erfolgten auf, mit Aminosilan modifizierten, Glasobjektträgern (Modifizierung siehe Kapitel 2.5.1). Es wurden 20 μ l der zu vermessenden Probe auf den Objektträger gegeben, nach zwei Minuten mit doppelt destilliertem Wasser abgespült, mit Druckluft getrocknet und anschließend unter das AFM gelegt.

Mit der CSC37/noAl-Spitze wurde zunächst im „intermittent contact (air)“-Modus ein Bild der Partikel aufgenommen, um die Nanopartikel lokalisieren zu können. Die Bildgröße lag je nach Partikelgröße zwischen 10 x 10 μ m und 25 x 25 μ m mit 2048 Pixeln je Bild.

Normalerweise werden für diese Abbildungen im „intermittent contact (air)“-Modus non-contact-Spitzen, also z.B. NSC16/AIBS, verwendet. Da es aber bei diesem Experiment erforderlich war, genau zu wissen wo die Proben lagen und eine Abbildung im „contact“-Modus nicht möglich war, weil die Partikel sich dabei verschoben, wurde hier mit der „contact“-Spitze eine „non-contact“-Abbildung gemacht. Die Qualität der Bilder war dabei deutlich schlechter, als mit einer NSC-Spitze, aber mehr als ausreichend, um die Nanopartikel für die Kraftmessungen zu lokalisieren. Der Relative Setpoint (Eindrücktiefe) betrug 10 % der Partikelhöhe, um Substrateinflüsse zu vermeiden. Die Z-Range betrug 5,85 μm , die Z-Length war 1 μm und Extend/Retract Time wurden auf 0,5 Sekunden festgelegt.

2.4.3 AUSWERTUNG DER KRAFTKURVEN

Die Auswertung der Kraftkurven erfolgte mit der geräteeigenen Software JPK Image Processing. Als Spitzenform wurde das Paraboloid gewählt, da dies der tatsächlichen Form der AFM-Spitze bei der geringen Eindrücktiefe entspricht. Als Poisson-Zahl wurde 0,5 angenommen, da dieser Wert für vollständig nicht komprimierbare Materialien gültig ist und die genaue Poisson-Zahl für das verwendete Polymer nicht bekannt ist ⁷⁰. Die Ergebnisse wurden aus fünf verschiedenen Partikeln mit jeweils zehn Kraftmessungen berechnet und als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung angegeben.

2.5 PLAQUE TARGETING

Beim Plaque-Targeting sollen Plaques im Blutgefäß mit Hilfe von, mit Antikörpern modifizierten, liposomalen Ultraschallkontrastmitteln dargestellt werden, indem die Formulierungen aufgrund der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung an der Plaque haften bleiben, und ungebundenes Kontrastmittel mit dem Blutstrom weiter geführt wird. Anschließend sollten nur noch die Plaques als hell leuchtende Stellen in einer dunkleren Umgebung zu erkennen sein. Siehe dazu auch Abbildung 12.

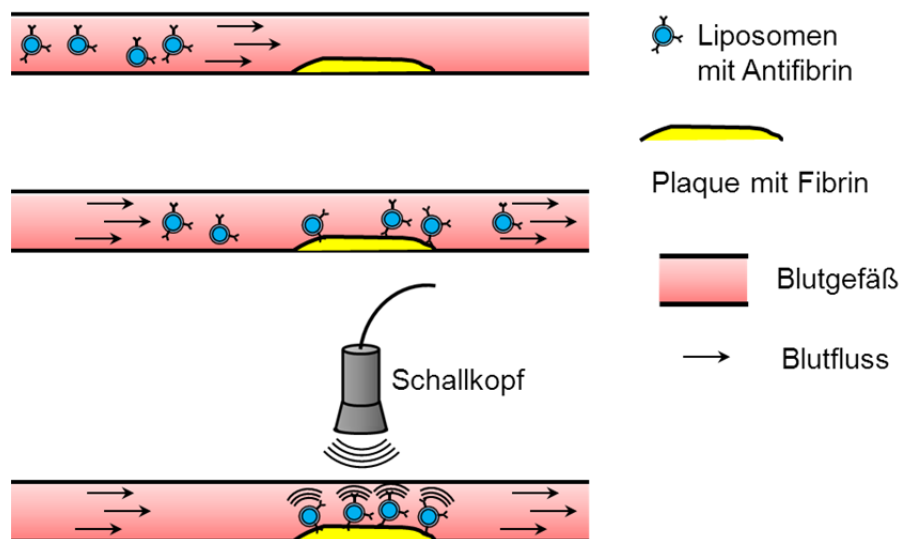


Abbildung 12: Darstellung des Plaque-Targetings mittels mit Antikörpern gekoppelter Ultraschallkontrastmittel.

Die mit Antikörpern gekoppelten Ultraschallkontrastmittel wurden zunächst auf, mit Fibrin modifizierten, Glasobjektträgern mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht und die Bindung von Antifibrin gekoppelten Liposomen an Fibrin gezeigt (s. Kapitel 2.5.1). In einem einfachen *in vitro* Plaque-Modell konnte dann die stabile Bindung von mit Antikörpern gekoppelten Liposomen an künstlichen Plaques im Fluss dargestellt werden. Anschließend wurde das Plaque-Modell mit menschlichen Plaques (Klinikmaterial St. Georg Klinikum,

Eisenach, Thüringen) erweitert und auch hier konnte die Bindung gezeigt werden (s. Kapitel 2.5.2).

2.5.1 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE

Um die Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Rasterkraftmikroskop bildlich darzustellen, mussten Fibrin-modifizierte Objektträger vorbereitet werden.

Die Modifizierung der Objektträger erfolgte anhand einer Anleitung von Hinterdorfer *et al.* in einer leicht abgewandelten Form ⁷⁴. Die Glasobjektträger wurden in Caro'scher Säure 10 Minuten inkubiert, um Verunreinigungen zu entfernen und die Oberfläche mit freien Silanol-Gruppen anzureichern, anschließend mit Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die freien Silanol-Gruppen ermöglichten die Silanisierung der Oberfläche mit 3-Aminopropyl-Triethoxysilan (Dynasylan® AMEO, Evonik Degussa GmbH, Hanau-Wolfgang, Deutschland). Hierfür wurden die Objektträger eine Stunde lang in eine organische Lösung von 3-Aminopropyl-Triethoxysilan (20 µl/ml Chloroform) getaucht, anschließend mit reinem Chloroform gewaschen, mit Druckluft getrocknet und schließlich in einem Trockenschrank eine Stunde lang bei 105 °C erhitzt. Es folgte ein zweistündiges Eintauchen der Objektträger in eine organische Lösung von Cyanur-Chlorid (1 mg/ml Chloroform) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), die 20 µl N,N-Diisopropyl-Ethylamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) enthielt, gefolgt vom Spülen mit reinem Chloroform und Trocknung mit Druckluft. Abschließend wurden die vorbereiteten Objektträger in einer Fibrin-Lösung (10 mg/ml Boratpuffer pH 8,8) über Nacht inkubiert und danach mit reinem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. In Abbildung 13 ist die Modifizierung der Glasobjektträger schematisch dargestellt.

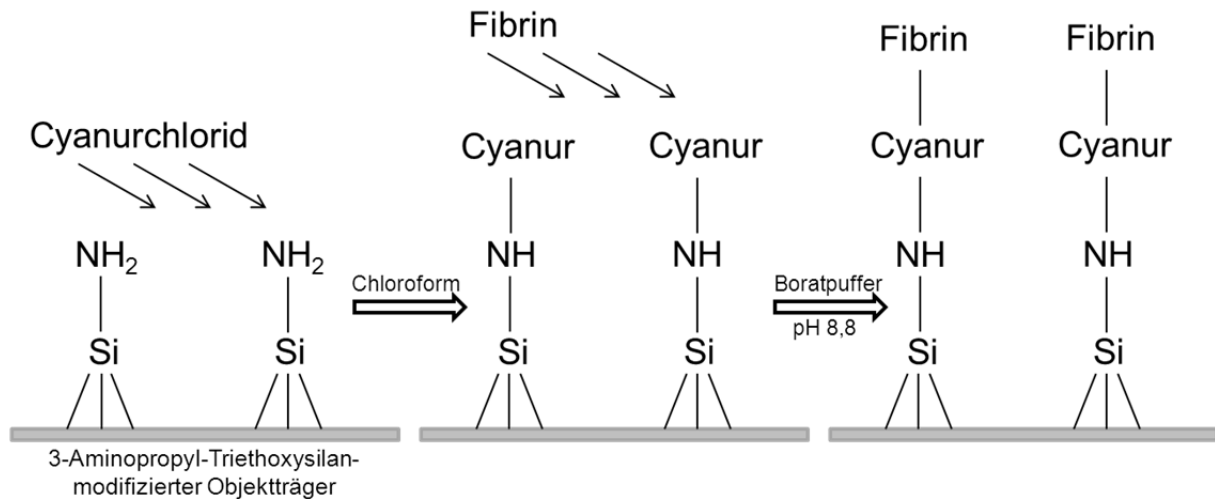


Abbildung 13: Modifizierung von Objektträgern mit Fibrin.

Auf die mit Fibrin modifizierten Objektträger wurden 20 µl der mit Antikörper gekoppelten liposomalen Formulierungen gegeben, nach zwei Minuten die überstehende Flüssigkeit abgeklopft, der Objektträger gespült, mit Druckluft getrocknet und anschließend unter das AFM gelegt.

Gemessen wurde mit kommerziell erhältlichen, pyramidalen Si₃N₄-Spitzen (NSC16/AlBS, MikroMasch, Estland) auf einem Cantilever (Länge 230 µm, Resonanzfrequenz 170 kHz und nominale Kraftkonstante 40 N/m) mit einer Geschwindigkeit von 0,8 Hz. Die Pixelrate lag bei 512 x 512 Pixeln und die Bildgröße bei 2 x 2 µm (wenn nicht anders angegeben). Beim NanoWizzard wurde der „intermittent contact (air)“-Modus ausgewählt (entsprechend dem tapping modeTM beim Nanoscope IV Bioscope von Veeco), was eine möglichst schonende Abtastung der Oberfläche ermöglicht.

2.5.2 FLUSSMODELL MIT *IN VITRO* PLAQUE-MODELL

Um die mit Antikörpern gekoppelten Kontrastmittel auf ihre Bindungsfähigkeit an fibrinreiche Plaques testen zu können, wurde ein erstes, einfaches *in vitro* Plaque-Modell entwickelt. Hierzu wurde ein ca. 45-50 cm langes Stück eines C-Flex® Schlauches in mehrere schmale Streifen geschnitten, ein spezieller, inerter Zweikomponenten-Kleber (Blau-Gelb-Kleber) auf mehrere Stellen der Schlauchstreifen aufgebracht und der noch feuchte Kleber mit Fibrinpulver aus menschlichem Plasma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) bestreut. Nach dem Trocknen des Klebers konnte überschüssiges Fibrinpulver entfernt und das Plaque-Modell verwendet werden. Das Plaque-Modell wurde durch menschliche Plaques (aus der Carotis) erweitert, welche klein geschnitten (siehe auch Abbildung 15) und ebenfalls mit Blau-Gelb-Kleber auf die Schlauchstreifen geklebt wurden. In Abbildung 14 sind die mit Fibrinpulver und Plaque-Stückchen modifizierten Schlauchstreifen zu sehen.

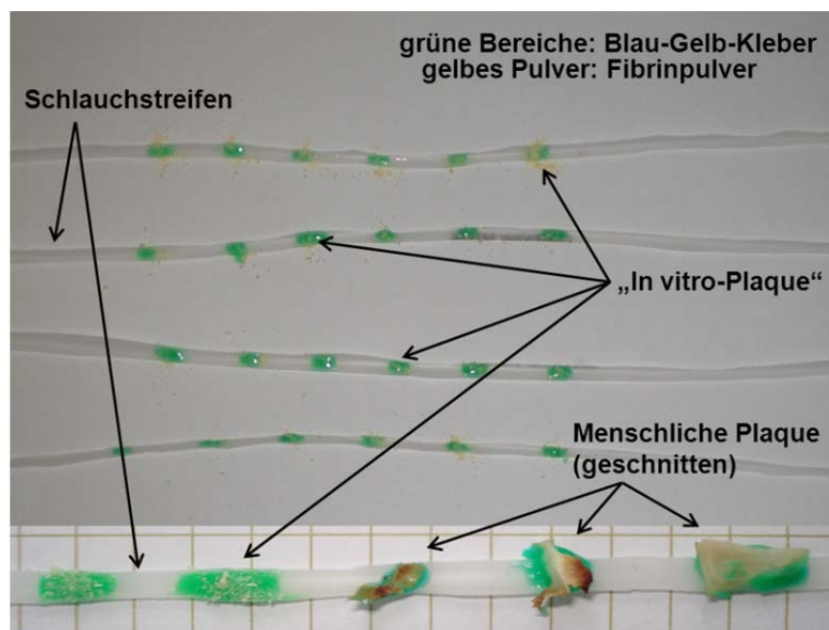


Abbildung 14: Mit Fibrinpulver und Plaque-Stückchen (aus menschlicher Halsschlagader) modifizierte C-Flex® Schlauchstreifen.

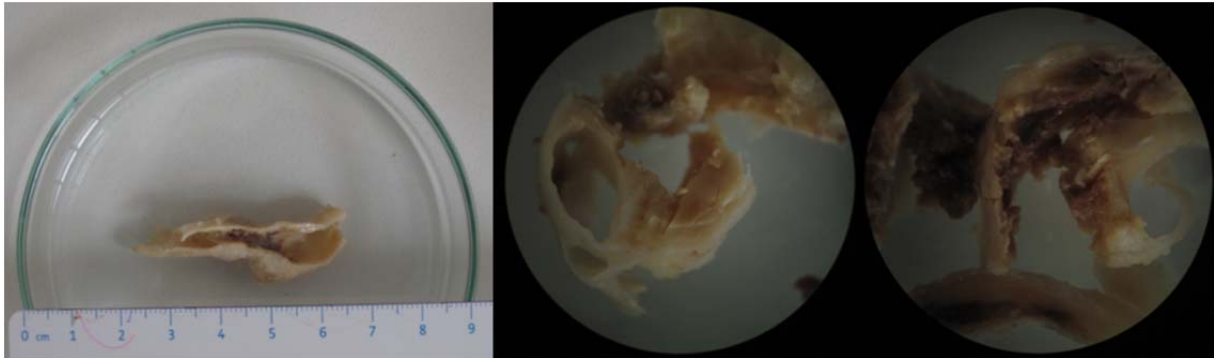


Abbildung 15: Stück einer menschlichen Carotis mit einer großen Plaque (links), klein geschnittene Plaque (rechts).

In einem statischen Experiment wurden die mit Fibrin-Antikörpern modifizierten liposomalen Formulierungen auf die künstlichen bzw. menschlichen Plaques getropft und nach wenigen Minuten konnten die Streifen mit Hilfe einer Drahtschlinge in das Flussmodell so eingefügt werden, dass sich die Plaques im Bereich des Ultraschallstrahls befanden. In Abbildung 16 ist die Position des Schlauchstreifens im Flussmodell schematisch dargestellt. Nachdem mit der Rollerpumpe ein konstanter Fluss hergestellt und ungebundenes Kontrastmittel weggespült war, konnte im Ultraschallbild das Bindungsvermögen beobachtet werden.

Weder der Blau-Gelb-Kleber noch das Fibrinpulver selbst zeigten beim Beschallen mit Ultraschall einen eigenen Kontrast im Ultraschallbild. Lediglich der Streifen selbst war manchmal aufgrund von anhaftenden kleinen Luftbläschen zu sehen.

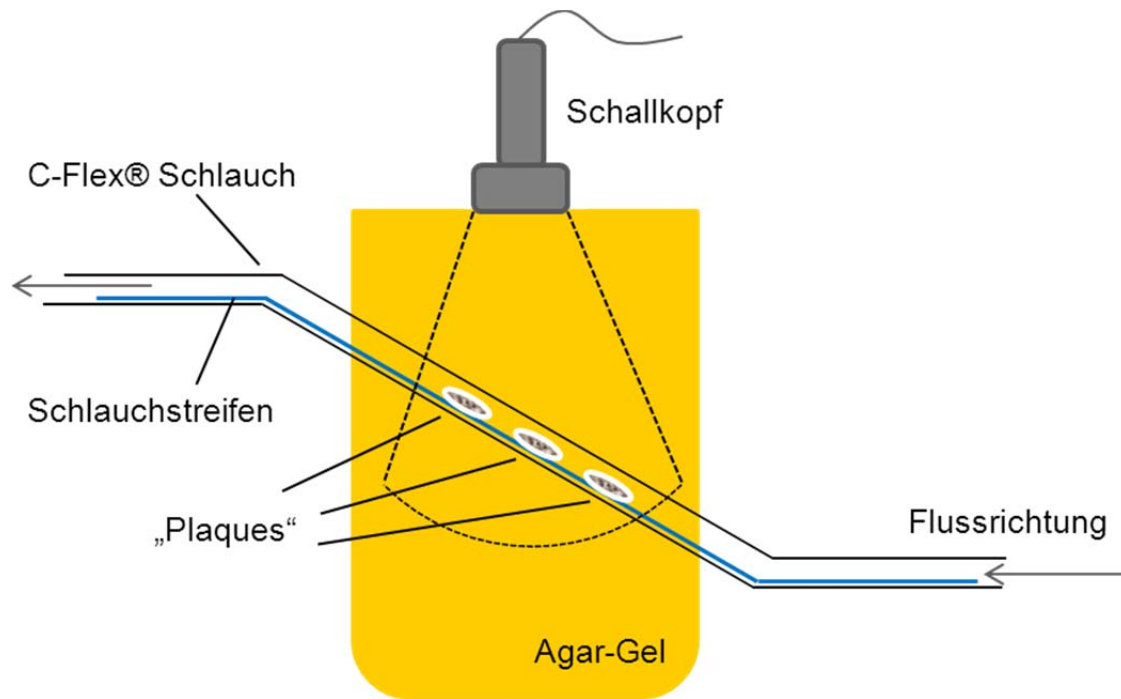


Abbildung 16: Einfügen des Schlauchstreifens in das Flussmodell, schematisch dargestellt.

**KAPITEL 3: NANOSKALIGE
ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-
NANOPARTIKEL**

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER- NANOPARTIKEL

Im Folgenden soll die Entwicklung von lang-zirkulierenden, ultraschallaktiven und bioverträglichen liposomalen Formulierungen dargestellt werden, deren Größen im nanoskaligen Bereich eine gute Stabilität und starke Kontrastverstärkung aufweisen. Zu diesem Zweck wurden mehrere verschiedene liposomale Formulierungen hergestellt und zunächst im Hinblick auf ihre physikochemischen Eigenschaften mittels PCS und LDA (Größe und Zetapotential), sowie Cryo-TEM und AFM (Morphologie) geprüft und mit dem käuflich erhältlichen Ultraschallkontrastmittel SonoVue® verglichen. Mit Hilfe von Phosphat-31-NMR wurden zusätzlich Morphologie und supramolekulare Organisation der Lipide innerhalb der Formulierungen analysiert. Die verwendeten Formulierungen waren Phospholipon, DPPC/CH, DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S.

Es wurden außerdem weitere unterschiedliche Lipidmischungen sowie Mischungen mit Antikörpern für spezifisches Targeting hergestellt und ebenfalls mit PCS und LDA, sowie AFM (nur Antikörper-gekoppelte Formulierungen) charakterisiert. Die verwendeten Formulierungen waren DPPC/MPEG5000, DSPC/MPEG5000, DPPC/PEG40S/DPPE, DPPC/PEG40S/DPPE, DMPC/PEG40S, DPPE/PEG40S, DPPG/PEG40S, DOTAP/PEG40S, DPPC/PEG40S/TEL und DSPC/PEG40S/TEL bzw. für die Antikörper-Kopplung DSPC/PEG40S/DPPE-CC und DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC.

Für die Messungen der elastischen Eigenschaften von nanoskaligen Systemen (siehe Kapitel 6), wurden Polymer-Nanopartikel aus PLGA hergestellt und mit PCS und LDA deren Größe und Zetapotential, sowie mit Rasterkraftmikroskopie die Morphologie bestimmt.

3.1 ERGEBNISSE

3.1.1 GRÖÖE, ZETAPOTENTIAL

Der hydrodynamische Durchmesser aller liposomalen und polymeren Formulierungen, ermittelt mittels PCS, ist in den Tabellen 1-5 zusammengefasst. Die Größenwerte sind als Z-Ave angegeben \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Proben.

Tabelle 1: Größe und Zetapotential der ultraschallaktiven, nanoskaligen Kontrastmittel bestimmt mit LDA, PCS, AFM und Cryo-TEM (Auszug aus Tabelle in Referenz ⁷⁵).

Lipidmischung [mol%]	Zetapotential [mV]	Größe [nm]			Size range [nm]
		PCS (Pdi)	AFM	TEM	
SonoVue [®]	n.d.	n.d.	1981 \pm 822	n.d.	250 – 6500
Phospholipon	-14,3 \pm 2,9	120,6 \pm 77,0 (0,46)	220,8 \pm 14,9	135,0 \pm 10,3	50 - 150
DPPC/CH (70:30)	-5,4 \pm 3,2	218,7 \pm 19,8 (0,45)	232,4 \pm 17,1	201,8 \pm 20,2	110 – 350
DPPC/PEG40S (98:2)	-1,7 \pm 0,8	173,4 \pm 18,2 (0,47)	216,7 \pm 15,6	133,1 \pm 17,7	50 – 500
DSPC/PEG40S (98:2)	-3,3 \pm 1,0	195,8 \pm 25,7 (0,54)	169,6 \pm 22,4	199,4 \pm 28,3	75 - 485

Die ersten hergestellten Kontrastmittel (siehe Tabelle 1) wurden umfassend charakterisiert, im Hinblick auf Größe, Morphologie und supramolekulare Zusammensetzung. Die mittleren Durchmesser variierten zwischen 120,6 \pm 77,0 nm für Phospholipon, 218,7 \pm 19,8 nm für

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

DPPC/CH (70:30), $173,4 \pm 18,2$ nm für DPPC/PEG40S (98:2) und $195,8 \pm 25,7$ nm für DSPC/PEG40S (98:2). Alle Größenverteilungen zeigten einen Pdi (Polydispersitätsindex) zwischen 0,45 und 0,54, was für eine multimodale Größenverteilung charakteristisch ist. Bei genauerer Betrachtung der Daten des Zetasizers war zu erkennen, dass jede der liposomalen Formulierungen hauptsächlich zwei Teilkollektive aufwies. Das kleinere lag in einem Bereich von 70-120 nm und das größere zwischen 300 und 500 nm. Wie erwartet, wiesen alle Formulierungen ein negatives Zetapotential auf. Es war nicht möglich SonoVue® mit dem Zetasizer zu vermessen.

Tabelle 2: Vergleich von Partikelgröße und Zetapotential nach unterschiedlichen Herstellungsmethoden der liposomalen Formulierungen.

Lipidmischung [mol%]	Zetapotential [mV]	Größe [nm] (Pdi)
Ultraschallbad DPPC/PEG40S (98:2)	$-2,0 \pm 1,1$	$140,8 \pm 103,7$ (0,38)
Ultraschallstab DPPC/PEG40S (98:2)	$-2,6 \pm 0,7$	$119,7 \pm 13,6$ (0,51)
DPPC/PEG40S (91:9)	$-5,3 \pm 1,2$	$157,2 \pm 60,2$ (0,38)
Ultraschallbad DSPC/PEG40S (98:2)	$-3,2 \pm 0,6$	$123,6 \pm 48,4$ (0,45)
Ultraschallstab DSPC/PEG40S(98:2)	$-3,9 \pm 0,9$	$161,3 \pm 9,1$ (0,49)
DSPC/PEG40S (91:9)	$-3,9 \pm 1,6$	$155,0 \pm 1,8$ (0,41)

Tabelle 2 vergleicht die Partikelgrößen und das Zetapotential der liposomalen Formulierungen, nachdem diese mit unterschiedlichen Methoden hergestellt wurden. Die erste Methode war eine Herstellung nur mit Ultraschallbad, die zweite Methode die zusätzliche Behandlung mit einem Ultraschallstab. Das Zetapotential fiel bei DPPC/PEG40S von $-2,5 \pm 1,1$ mV auf $-2,6 \pm 0,7$ mV, wenn die Suspension mit dem Ultraschallstab beschallt

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

wurde. Wenn zusätzlich noch mehr PEG40S enthalten war, sank das Potential nochmals ein wenig ab auf $-5,3 \pm 1,2$ mV. Ähnliches war bei DSPC/PEG40S zu beobachten, wo das Zetapotential von $-3,2 \pm 0,6$ mV auf $-3,9 \pm 0,9$ mV fiel, wenn die Suspension mit dem Ultraschallstab behandelt wurde und blieb bei größerer PEG40S-Menge bei $-3,9 \pm 1,6$ mV. Der hydrodynamische Durchmesser ist als Z-Ave angegeben. Bei der Behandlung mit dem Ultraschallstab reduzierte sich die Größe der DPPC/PEG40S (98:2) Formulierung von $140,8 \pm 103,7$ nm auf $119,7 \pm 13,6$ nm und die Größe der DSPC/PEG40S (98:2) Formulierung stieg von $123,6 \pm 48,4$ nm auf $161,3 \pm 9,1$ nm. Die Formulierungen mit dem höheren PEG-Anteil waren bei DPPC/PEG40S (91:9) $157,2 \pm 60,2$ nm groß und bei DSPC/PEG40S (91:9) $155,0 \pm 1,8$ nm. Der Pdi schwankte bei allen Formulierungen zwischen 0,38 und 0,51 und zeigte somit eine multimodale Größenverteilung an.

Tabelle 3: Größe und Zetapotential weiterer Lipidmischungen zur späteren Untersuchung auf Eignung als Ultraschallkontrastmittel.

Lipidmischung [mol%]	Zetapotential [mV]	Größe [nm] (Pdi)
DPPC/DPPE-MPEG5000 (91:9)	$-15,8 \pm 0,4$	$394,3 \pm 117,1$ (0,46)
DSPC/DPPE-MPEG5000 (91:9)	$-20,6 \pm 0,4$	$1061,8 \pm 518,0$ (0,72)
DPPC/CH/TEL (65:25:10)	-11,3	951,9 (0,74)
DPPC/PEG40S/TEL (98:2:2)	-2,5	395,4 (0,48)
(98:2:5)	-3,3	71,9 (0,36)
(98:2:10)	-7,1	445,8 (0,51)

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

DSPC/PEG40S/TEL		
(98:2:2)	-1,1	434,7 (0,47)
(98:2:5)	-1,3	652,8 (0,65)
(98:2:10)	-1,9	411,7 (0,53)
DPPC/PEG40S/DPPE		
(98:2:10)	-4,5	145,2 (0,59)
DSPC/PEG40S/DPPE		
(98:2:10)	-7,2	180,1 (0,42)
DMPC/PEG40S		
(98:2)	-13,5	114,7 (0,51)
(91:9)	-10,8	153,1 (0,43)
DPPE/PEG40S		
(98:2)	-19,0	963,8 (0,68)
(91:9)	-15,0	163,6 (0,36)
DPPG/PEG40S		
(98:2)	-28,5	211,5 (0,29)
(91:9)	-33,0	292,1 (0,46)
DOTAP/PEG40S		
(98:2)	47,7	256,2 (0,39)
(91:9)	34,3	443,7 (0,45)

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der PCS- und LDA-Messungen von weiteren Lipidmischungen aufgeführt. DPPC/DPPE-MPEG5000 bzw. DSPC/DPPE-MPEG500 (je 91:9) unterschieden sich sehr voneinander mit $394,3 \pm 117,1$ nm und $1061,8 \pm 518,0$ nm. Eine Zumischung von 2, 5 und 10 mol% Tetraetherlipiden führte ebenfalls zu einer starken Vergrößerung der mittleren Partikelgrößen. Die Durchmesser lagen für DPPC/CH/TEL (65:25:10) bei 951,9 nm, für DPPC/PEG40S/TEL (98:2:2/5/10) bei 395,4 nm/71,9 nm/445,8 nm und für DSPC/PEG40S/TEL (98:2:2/5/10) bei 434,7 nm/652,8 nm/411,7 nm. Eine Zumischung von DPPE resultierte in Partikelgrößen von 145,2 nm für DPPC/PEG40S/DPPE (98:2:10) und 180,1 nm für DSPC/PEG40S/DPPE (98:2:10). Eine Mischung verschiedener Lipide mit PEG40S ergab Durchmesser von 114,7 bzw. 153,1 nm für DMPC/PEG40S (98: bzw. 91:9), von 963,8 bzw. 163,6 nm für DPPE/PEG40S (98:2 bzw. 91:9), von 211,5 bzw. 292,1 nm für DPPG/PEG40S (98:2 bzw.

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

91:9) und 256,2 bzw. 443,7 nm für DOTAP/PEG40S (98:2 bzw. 91:9). Die Polydispersitätsindizes lagen zwischen 0,29 und 0,74, was eine multimodale Größenverteilung bedeutete. Die liposomalen Formulierungen waren alle negativ geladen. Das Zetapotential lag zwischen -1,1 und -30,8 mV, mit Ausnahme der Mischungen mit DOTAP, welches ein stark positiv geladenes Lipid ist, und daher wiesen die Mischungen mit diesem Lipid ein positives Zetapotential von 34,3 bzw. 47,7 mV auf.

Tabelle 4: Größe und Zetapotential der Lipidmischungen mit Ankerlipiden und Antikörpern.

Lipidmischung [mol%]	Zetapotential [mV]	Größe [nm] (Pdi)
DSPC/PEG40S/DPPE-CC (91:9:10)	-18,6 ± 3,8	189,5 ± 60,2 (0,47)
DSPC/PEG40S/DPPE-CC mit AK	-18,5 ± 4,7	185,8 ± 37,1 (0,58)
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC (91:9:10)	-35,1 ± 4,6	193,3 ± 19,1 (0,49)
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC mit AK	-41,6 ± 5,0	185,3 ± 60,7 (0,44)

Die Lipidmischungen, die mit Antikörpern gekoppelt wurden, beinhalteten zusätzlich ein Ankerlipid. In Tabelle 4 ist zu sehen, dass DSPC/PEG40S/DPPE-CC (91:9:10) eine Größe von 189,5 ± 60,2 nm hatte, welche nach der Kopplung mit Antikörpern leicht sank, auf 185,8 ± 37,1 nm. DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC (91:9:10) hatte einen hydrodynamischen Durchmesser von 193,3 ± 19,1 nm, welcher nach der Antikörperkopplung leicht auf 185,3 ± 34,3 nm abfiel. Der Pdi für alle Formulierungen war zwischen 0,44 und 0,58, das Zetapotential zwischen -18,6 und -41,6 mV. Durch die Kopplung mit Antikörpern

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

änderten sich das Zetapotential und der Pdi kaum. Die Kopplung mit Antikörpern müsste den Z-Ave der liposomalen Formulierungen vergrößern, da sich der hydrodynamische Durchmesser vergrößert, er wurde jedoch in beiden Fällen kleiner.

Tabelle 5: Größe und Zetapotential der Polymer-Nanopartikel.

Rührgeschwindigkeit [rpm]	Zetapotential [mV]	Größe [nm] (Pdi)
24000	-17,2 ± 2,5	202,8 ± 25,4 (0,05 ± 0,01)
20000	-17,8 ± 3,0	223,4 ± 8,6 (0,04 ± 0,01)
16000	-15,4 ± 2,9	248,4 ± 10,9 (0,07 ± 0,02)
12000	-15,8 ± 3,3	338,8 ± 18,7 (0,19 ± 0,04)

Die Größe der Polymer-Nanopartikel wurde reproduzierbar durch das Herstellungsverfahren gesteuert (s. Tabelle 5). Hierbei wurden bei der Emulsionsbildung unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten des Ultra Turrax® verwendet, nämlich 24000, 20000, 16000 und 12000 rpm (Umdrehungen pro Minute). Mit abnehmender Rührgeschwindigkeit nahmen die Partikelgrößen zu (siehe dazu auch Abbildung 17). Bei 24000 rpm wiesen die Nanopartikel einen Durchmesser von 202,8 ± 25,4 nm auf, welcher über 223,4 ± 8,6 nm (20000 rpm) und 248,4 ± 10,9 nm (16000 rpm) bis 338,8 ± 18,7 nm (12000 rpm) weiter stieg. Die Größenverteilung, charakterisiert durch den Pdi, zeigte eine monomodale Größenverteilung

3. NANOSKALIGE ULTRASCHALLKONTRASTMITTEL UND POLYMER-NANOPARTIKEL

(Pdi zwischen 0,04 und 0,19). Das Zetapotential war immer negativ und lag zwischen -15,4 und -17,8 mV.

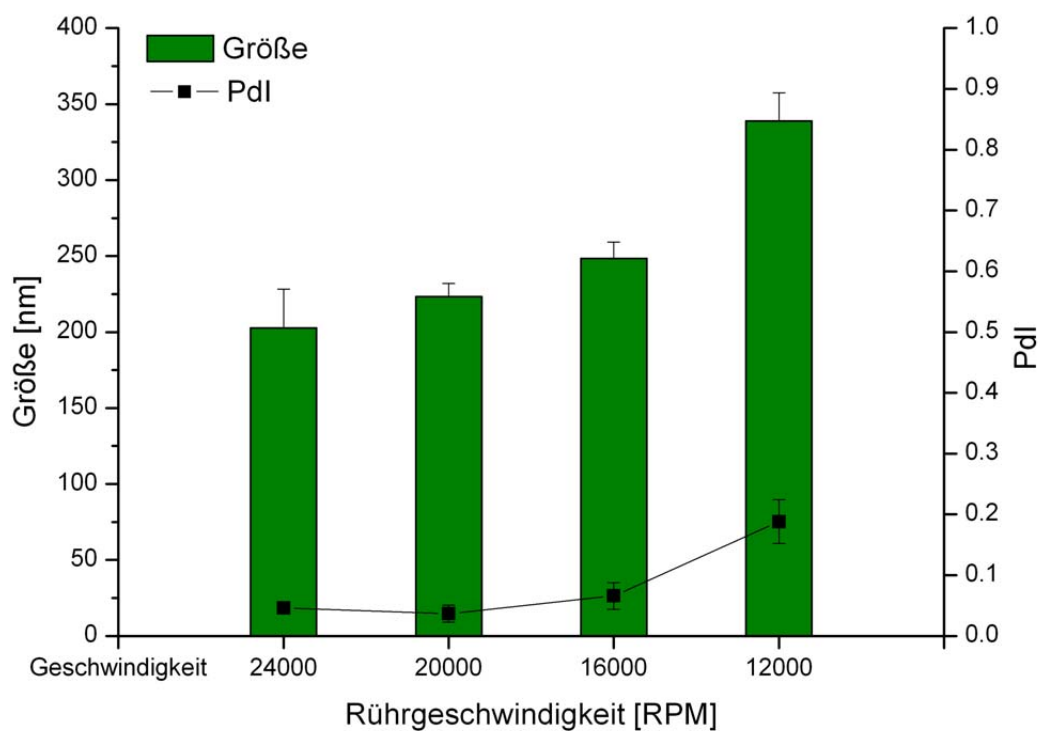


Abbildung 17: Größe und Pdi der Polymer-Nanopartikel nach Herstellung bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten des Ultra Turrax®.

3.1.2 MORPHOLOGIE

3.1.2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie erlaubt eine Visualisierung aller Formulierungen unter hydrolysierten Bedingungen und eine Bestätigung der Liposomengrößen und Nanopartikelgrößen, die mit PCS ermittelt wurden. Hierbei wurden zur Bestimmung der Größen alle sichtbaren Partikel innerhalb eines repräsentativen Messbereichs einzeln ausgewertet. Siehe dazu auch Tabelle 2 und Abbildung 18. Prinzipiell können die erhaltenen Werte von den Werten der PCS-Messungen abweichen. Dies kann durch Interaktionen der weichen, flexiblen liposomalen Formulierungen bzw. der Nanopartikel mit der Oberfläche des Silikon-Chips der Rasterkraftmikroskop-Spitze hervorgerufen werden, was zur Entstehung von Artefakten führen kann. Jedoch erlaubt die individuelle Betrachtung der Formulierungen einen Ausschluss solcher Artefakte bei weiteren Vermessungen. Zusätzlich ist es durch die bildliche Darstellung solcher Artefakte möglich, die Stabilität der Formulierungen zu beurteilen.

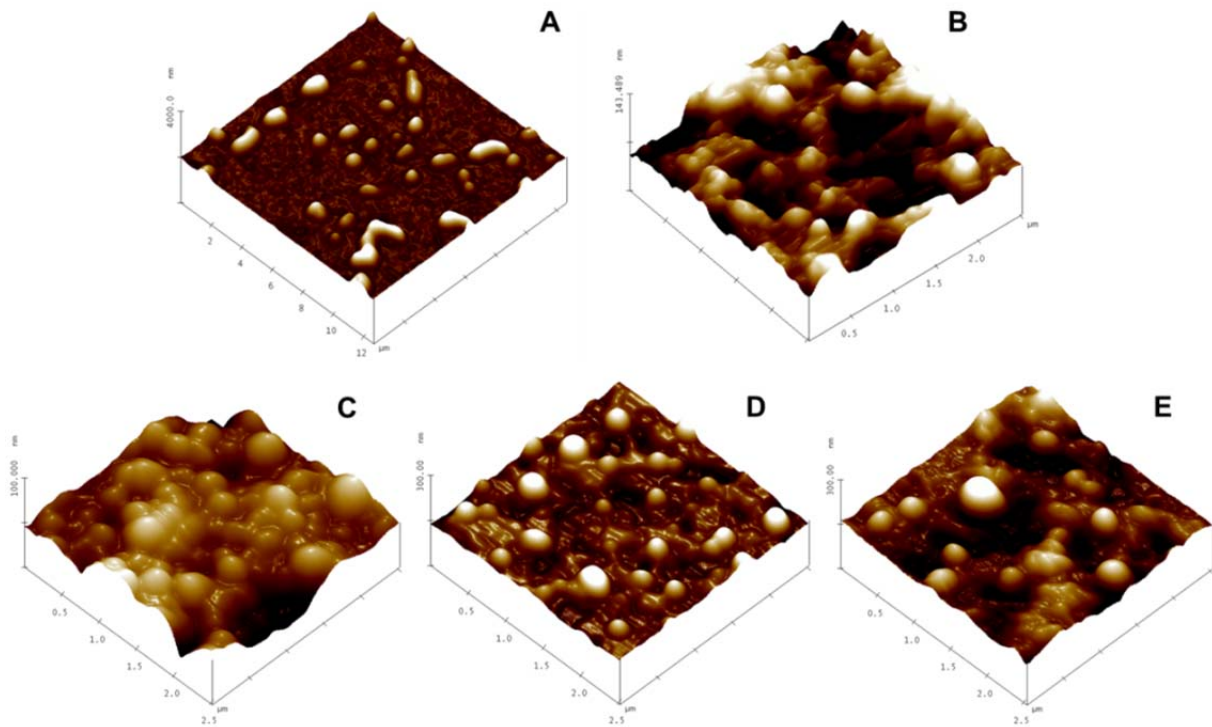


Abbildung 18: Bildliche Darstellung der Morphologie und Größenverteilung der verschiedenen liposomalen Formulierungen mit dem AFM. (A) SonoVue®, (B) Phospholipon, (C) DPPC/CH, (D) DPPC/PEG40S, (E) DSPC/PEG40S. Alle Bilder sind im Höhen-Modus dargestellt. Bildgröße 2,5x2,5 µm (Bildmaterial z.T. aus Ref. ⁷⁵).

Die Formulierungen Phospholipon, DPPC/CH, DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S wiesen mittlere Partikelgrößen von $220,8 \pm 14,9$ nm, $232,4 \pm 17,1$ nm, $216,7 \pm 15,6$ nm und $169,6 \pm 22,4$ nm auf, während PCS-Messungen kleinere Werte für Phospholipon (120 nm) (Abbildung 18B), DPPC/CH (220 nm) (Abbildung 18C) und DPPC/PEG40S (175 nm) (Abbildung 18D) sowie größere Werte für DSPC/PEG40S (195 nm) (Abbildung 18E) ergaben. Bei DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S konnten zwei große Teilkollektive beobachtet werden. Die größere Fraktion zeigte mittlere Durchmesser zwischen 200 und 300 nm und die kleinere Fraktion Größen von ungefähr 70 nm. Dies deckte sich mit den Ergebnissen der PCS-Messungen. Die größeren Partikel waren ideal rund, während die kleineren unterschiedliche Formen aufwiesen, von rund über oval zu stäbchenförmig. Beide Fraktionen waren relativ resistent gegenüber der Silikon-Oberfläche. Bei den Phospholipon

und DPPC/CH Formulierungen konnte nur eine Partikelfraktion gefunden werden. Die Liposomen waren ebenfalls rund und hatten eine glatte Oberfläche und sie waren stabil gegenüber der Silikon-Oberfläche. Die mittlere Partikelgröße von SonoVue® (Abbildung 18A) war 1981 ± 822 nm mit einer sehr breiten Größenverteilung zwischen 250 bis 6500 nm.

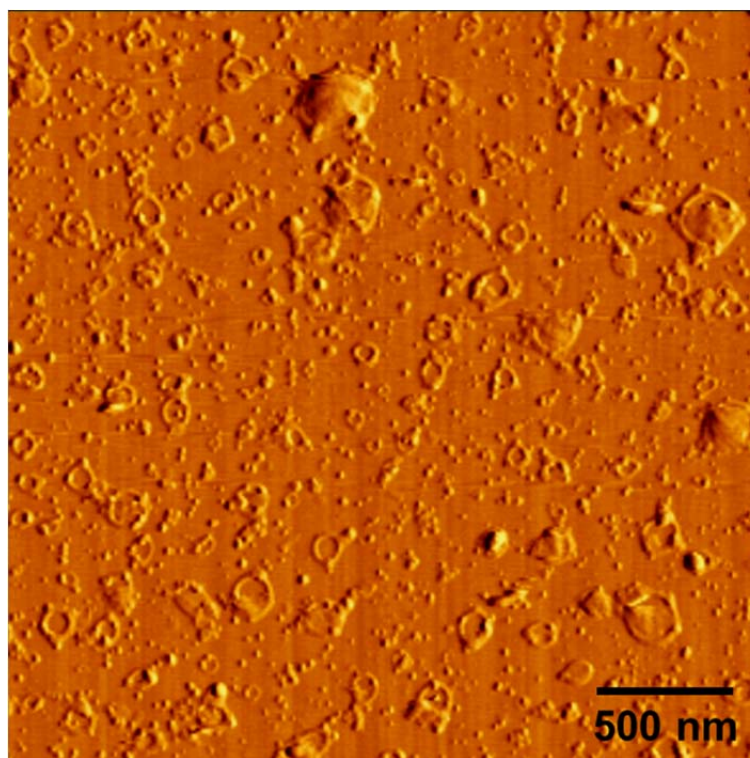


Abbildung 19: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von Antikörpern gekoppelt an DSPC/PEG40S-Liposomen mit Ankerlipid.

Bei AFM-Aufnahmen der mit Antikörpern gekoppelten Liposomen (Abbildung 19) war zu erkennen, dass diese Formulierungen dazu neigten, auf der Oberfläche zu spreiten. Sie waren als ringförmige Strukturen zu erkennen, welche typisch für Mizellen sind. Die Antikörper waren als kleine Punkte zu erkennen, die an den Ringen hafteten oder auch frei zwischen den Ringen lagen.

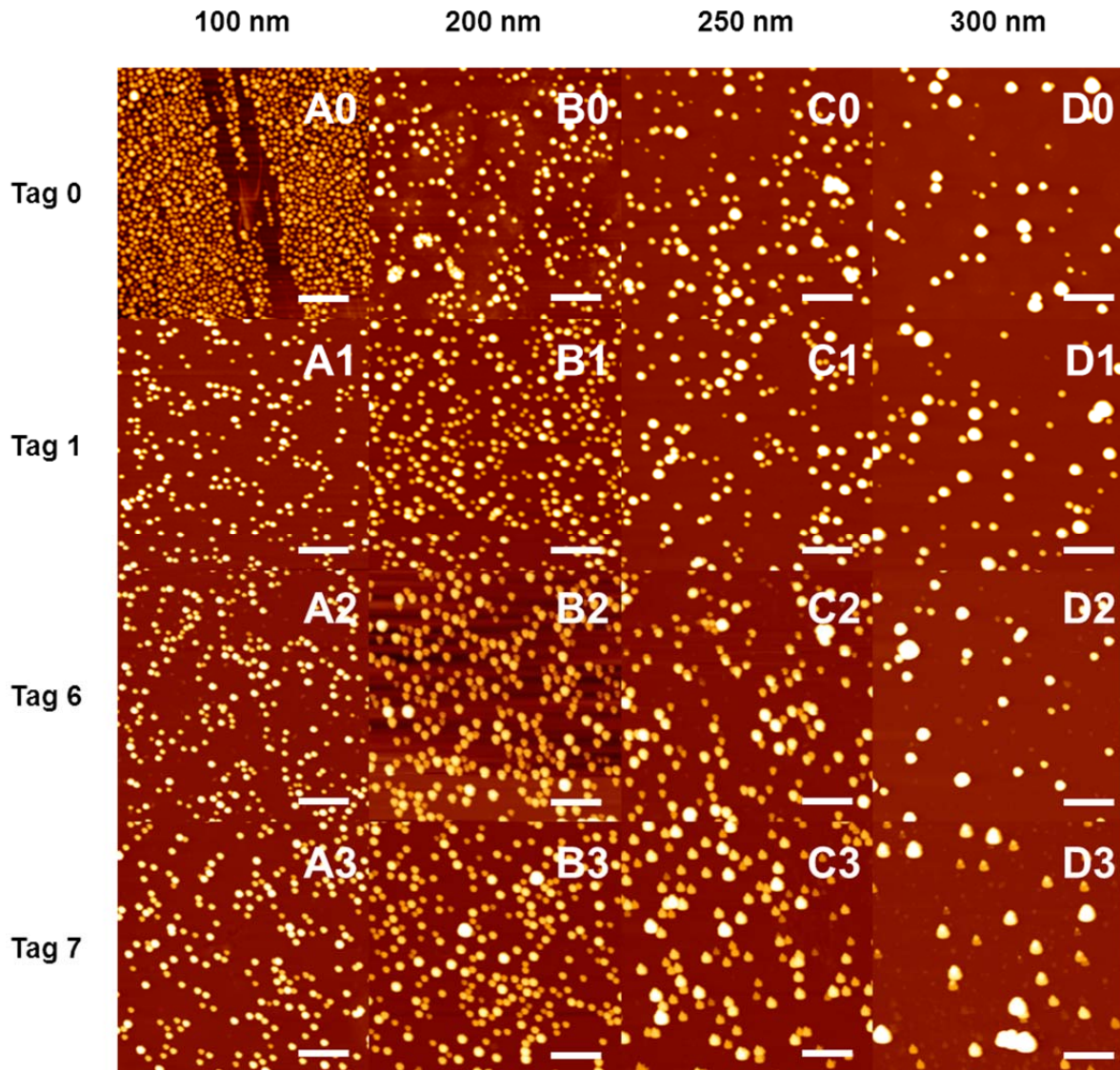


Abbildung 20: Bilder der Polymer-Nanopartikel aufgenommen an Tag 0, 1, 6 und 7 nach der Herstellung (Darstellung im Höhen-Modus). (A0-A3) 150 nm, (B0-B3) 200 nm, (C0-C3) 250 nm, (D0-D3) 300 nm. Größenbalken (weiß) entsprechen 2 µm.

Die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen der Polymer-Nanopartikel zeigten gleichmäßig runde Nanopartikel mit einer glatten Oberfläche. Die Nanopartikel waren leicht anfällig dafür, mit der Spitze des Rasterkraftmikroskops zu interagieren. In Abbildung 20 B2, C3 und D3 sind daher Artefakte zu erkennen. Die Partikelgrößen änderten sich im Verlauf einer Woche nicht.

3.1.2.2 Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Cryo-TEM ist ebenfalls ein Verfahren, mit dem die liposomalen Formulierungen bildlich dargestellt werden können, um Größe und Morphologie der Formulierungen zu beurteilen. Hierbei kann jedoch zusätzlich, im Unterschied zum AFM, die Lamellarität der hergestellten liposomalen Formulierungen betrachtet werden. Repräsentative Aufnahmen zeigt Abbildung 21.

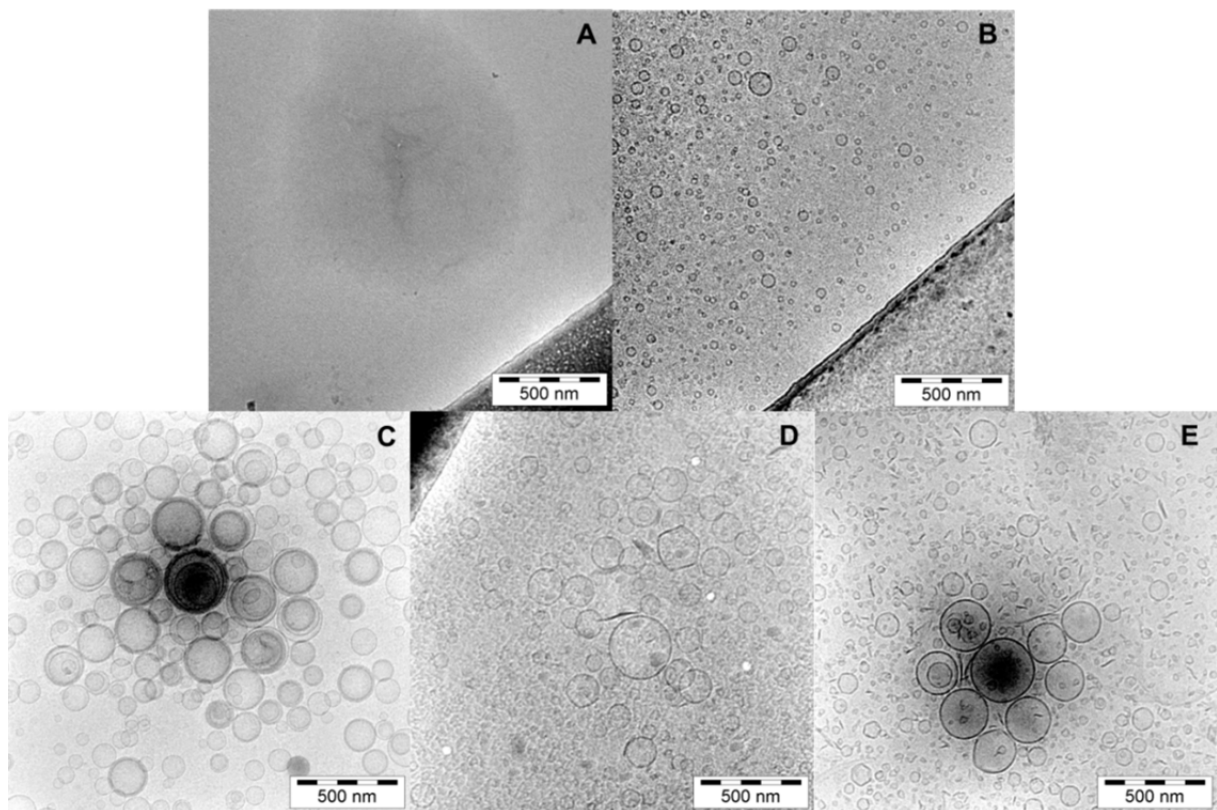


Abbildung 21: Cryo-TEM. (A) SonoVue[®], (B) Phospholipon, (C) DPPC/CH, (D) DPPC/PEG40S, (E) DSPC/PEG40S.

Bilder von Phospholipon (Abbildung 21B) und DPPC/CH (Abbildung 21C) zeigten typische, gleichmäßig verteilte, überwiegend unilamellare Liposomen mit einer mittleren Größe von $135,0 \pm 10,3$ nm für Phospholipon und $201,8 \pm 20,2$ nm für DPPC/CH. Bei DPPC/PEG40S

und DSPC/PEG40S (Abbildung 21D und 21E) war ein gleichzeitiges Vorhandensein von großen, runden liposomalen und kleineren, stäbchenförmigen mizellaren Strukturen zu erkennen. Die liposomalen Strukturen (Durchmesser ungefähr 250 nm) erschienen eher eckig und waren identisch mit der, bei AFM-Messungen gefundenen, größeren Partikelfraktion. Auch hier waren Teilkollektive von größeren und kleineren Partikeln zu erkennen. Die mittleren Durchmesser zeigten Werte zwischen $133,1 \pm 17,7$ nm für DPPC/PEG40S und $199,6 \pm 28,3$ nm für DSPC/PEG40S. SonoVue® zeigte nur diffuse Strukturen (Abbildung 21A). Vermutlich waren die Mikrobläschen bei der Präparation geplatzt.

3.1.2.3 Phosphat-31-Kernspinresonanzspektroskopie

Phosphat-31-Kernspinresonanzspektroskopie (Phosphat-31-NMR) kann dazu genutzt werden, zwischen liposomalen und mizellaren Anordnungen von Lipiden, innerhalb einer pharmazeutischen Formulierung, zu unterscheiden. Die Breite der Phosphat-31-Linie ist abhängig von Aggregat-Größe, Form und Eigen-Diffusion⁷⁶. Bei der Darstellung von Phosphat-31-NMR-Spektren für verschiedene Phospholipid-Zusammensetzungen kann eine Schulter im Niedrig-Feld für doppelschichtige Strukturen gesehen werden, während Mizellen eine symmetrische Spitze zeigen⁷⁷.

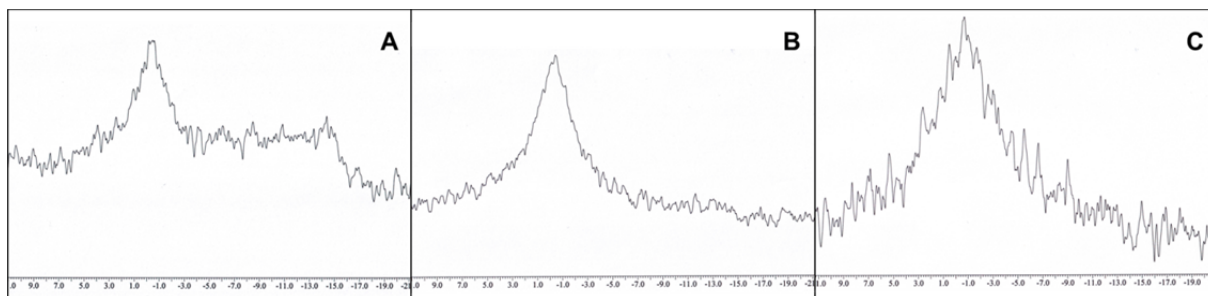


Abbildung 22: Phosphat-31-NMR-Spektren. (A) DPPC/CH, (B) DPPC/ PEG40S; (C) DSPC/PEG40S (Abbildung entnommen aus Referenz⁷⁵).

DPPC/CH zeigte im NMR-Spektrum (s.a. Abbildung 22A) eine Spitze mit einer Schulter, was zur Annahme führte, dass diese Lipidmischung überwiegend Liposomen enthielt. Die beiden anderen Formulierungen, DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S, wiesen im NMR-Spektrum (s.a. Abbildung 22B und 22C) einen symmetrischen Peak auf, was die Schlussfolgerung nahe legte, dass hier überwiegend Mizellen vorlagen.

3.2 DISKUSSION

Beim Ultraschallgestützten Plaque-Targeting kommt es darauf an, kleine, stabile und lang zirkulierende Formulierungen zu entwickeln, die eine gute Ultraschallkontrastverstärkung aufweisen und zusätzlich mit Antikörpern zum Targeting gekoppelt werden können.

Das gebräuchliche Ultraschallkontrastmittel SonoVue® besteht aus den Phospholipiden DSPC und DPPC gefüllt mit dem Gas Schwefelhexafluorid²⁵. Auch Forschergruppen befassen sich mit dem Thema Ultraschallkontrastverstärkung und verwenden Phospholipide zur Herstellung der Kontrastmittel⁷⁸. Talu *et al.*⁷⁹ verwendeten zusätzlich Polyethylenglykol(40)stearat (PEG40S) bei der Herstellung großer Mikrobläschen, deren Durchmesser $62 \pm 6 \mu\text{m}$ betrug. Dies führte zu einer verlängerten Zirkulationszeit im Körper, dem sogenannten Stealth-Effekt®. Durch sterische Stabilisierung von Liposomen, bspw. mit Polyethylenglykolketten, werden die Liposomen nicht so schnell vom Immunsystem erkannt und somit nicht so schnell von Makrophagen aufgenommen und aus dem Körper eliminiert⁸⁰. Die Kombination aus Phospholipiden und PEG40S für die Herstellung von lang zirkulierenden Ultraschallkontrastmitteln war erfolgreich für Mikrobläschen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Wissen genutzt, um neue Ultraschallkontrastmittel zu entwickeln, die nicht mehr Größen im Mikrometerbereich hatten, sondern im Nanometerbereich und dabei eine gute Ultraschallkontrastverstärkung und lange Zirkulationsdauer aufwiesen.

Unter Verwendung der gebräuchlichen Filmmethode, wurden nanoskalige, liposomale Formulierungen mit durchschnittlichen Größen von 120 bis 220 nm (gemessen mit PCS) hergestellt. Während Phospholipon und DPPC/CH eine homogene Größenverteilung mit einer durchschnittlichen Größe (Z-Ave) von $120,6 \pm 77,0 \text{ nm}$ (Pdi jedoch 0,46) bzw. $218,7 \pm 19,8 \text{ nm}$ (Pdi 0,45) aufwiesen, was mit früheren Ergebnissen übereinstimmte^{55, 81, 82},

zeigten die Formulierungen mit PEG40S (DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S) eine deutlich multimodale Größenverteilung mit einem Pdi von $\sim 0,5$. Bei genauerer Betrachtung der Zetasizer-Daten konnten zwei Hauptfraktionen gefunden werden. Ein Anteil war bei rund 70-120 nm und der andere zwischen 300 und 500 nm (diese Daten wurden hier jedoch nicht gezeigt).

Die Charakterisierung der liposomalen Formulierungen mit den bildgebenden Techniken AFM und Cryo-TEM bestätigten die Ergebnisse der PCS-Messungen und zeigten ebenfalls ein gleichzeitiges Vorkommen von kleinen Partikeln neben einer Fraktion größerer Partikel. Mit dem AFM erhielt man teilweise größere Werte für den Durchmesser der liposomalen Formulierungen aufgrund von Interaktionen der Formulierungen mit dem Cantilever. Für Phospholipon waren im Cryo-TEM überwiegend unilamellare Liposomen zu sehen und für DPPC/CH das für Liposomen typische, gleichzeitige Vorkommen von unilamellaren und multilamellaren Liposomen. Normalerweise besitzen Liposomen Größen zwischen 20 nm und mehreren Mikrometern ²⁶, während Mizellen Größen unter 80 nm aufweisen ⁸³. Es gibt also einen kleinen Bereich, in dem sowohl Liposomen als auch Mizellen vorliegen können. Das Auftreten der stäbchenförmigen Strukturen in den Cryo-TEM Bildern der PEG40S-haltigen Formulierungen deutet auf diskoidale Mizellen hin, welche, wenn sie von der Seite abgebildet werden, als stäbchenförmig Strukturen erscheinen und, wenn sie von vorne oder hinten abgebildet werden, als Scheiben zu erkennen sind ⁸⁴.

Garbuzenko *et al.* ^{85, 86} und Schroeder *et al.* ⁸⁷ erklärten dieses gleichzeitige Vorkommen von verschiedenen Strukturen, in ultraschallaktiven Formulierungen, durch nicht-ideales Mischverhalten von liposomenformenden Lipiden, wie bspw. von PEGylierten Lipiden. Es scheint möglich, dass unter ultraschallinduziertem Stress, Liposomen eine strukturelle Umwandlung erfahren und ein Teil der Liposomen kleinere, nicht-liposomale molekulare Zusammenschlüsse, möglicherweise mizellare Strukturen, bildet. Die mögliche Bildung von

mizellaren Scheiben (diskoidale Mizellen) aus PEG-Lipiden, in mit Ultraschall beschallten liposomalen Dispersionen, wurde von Leal *et al.* ⁷⁶, Ickenstein *et al.* ⁸⁸ und Schroeder *et al.* ^{87, 89, 90} berichtet. Die in der erwähnten Literatur verwendeten PEG-Lipide waren doppelkettige Lipide, bspw. DSPC mit einem PEG-Anteil. In den vorliegenden Mischungen wurden jedoch einkettige Fettsäuren, gekoppelt mit PEG, verwendet. Dies könnte zusätzlich einen Einfluss auf den mizellenbildenden Effekt haben.

Um sich die strukturelle Anordnung der Lipide in den Formulierungen genauer anzusehen wurden ³¹P-NMR-Messungen durchgeführt. Verschiedene Forschungsgruppen fanden heraus, dass mizellare von liposomalen Strukturen unterschieden werden können, indem man die Linienform der ³¹P-NMR-Spektren betrachtet. Schubert *et al.* stellten fest, dass Doppelschichtstrukturen, wie sie in Liposomen vorkommen, durch ein breites ³¹P-NMR-Signal dargestellt wurden, verursacht durch anisotrope Bewegungen der Lipide innerhalb der Doppelschicht ⁹¹. Nach Cullis und de Kruijff zeigten Doppelschichten im Niedrig-Feld eine Art Schulter, wohingegen Mizellen einen symmetrischen Peak zeigten ⁷⁷. Leal *et al.* analysierten den Einfluss von verschiedenen PEG-Lipiden und deren Konzentration auf die Struktur von liposomalen Formulierungen, die aus DSPC und CH bestanden. Konzentrationen von mehr als 11 mol% PEG-Lipid führten zu einer Bildung von Mizellen und Liposomen ⁷⁶. Vergleichbare Ergebnisse bezüglich Mizellen wurden auch von Soong und MacDonald gefunden ⁹². In Abbildung 22A ist eine Schulter im Niedrig-Feld zu sehen, die Doppelschichten, also Liposomen, zugeordnet werden konnte. Die beiden anderen ³¹P-NMR-Spektren zeigten eine symmetrische Spitze, was auf das Vorhandensein von Mizellen schließen ließ.

Auf den Einfluss der unterschiedlichen Herstellungsmethoden, Ultraschallbad und Ultraschallstab, wird in Kapitel 4 und 5 genauer eingegangen, da vor allem der Einfluss der Herstellungsmethode auf die Ultraschallkontrastverstärkung näher untersucht werden sollte.

Ein Vergleich der beiden verwendeten Herstellungsmethoden in Bezug auf die Größe, die Größenverteilung und das Zetapotential, siehe auch Tabelle 2, zeigte, dass mit dem Ultraschallstab der Z-Ave, bei gleichbleibendem Pdi, bei DPPC/PEG40S abnahm, bei DSPC/PEG40S jedoch zunahm. Das Zetapotential veränderte sich nur wenig, der Pdi blieb jedoch bei $\sim 0,4-0,5$, was bedeutete, dass die Herstellungsmethode weder einen starken Einfluss auf die Größe, noch das Zetapotential, noch auf die multimodale Größenverteilung ausübte.

Die weiteren Lipidmischungen aus Tabelle 3 wurden ebenfalls nur im Hinblick auf ihre Größe und Zetapotential charakterisiert, da auch hier vor allem die ultraschallkontrastverstärkenden Eigenschaften verschiedener Lipidmischungen untersucht werden sollten, welche in Kapitel 4 genauer erläutert und diskutiert werden. Die Verwendung eines doppelkettigen PEGlipids (DPPE-MPEG5000) in Kombination mit DPPC und DSPC erzielte ein stark negatives Zetapotential ($-15,8 \pm 0,4$ mV für DPPC/DPPE-MPEG5000 und $-20,6 \pm 0,4$ mV für DSPC/DPPE-MPEG5000) mit größeren Partikelgrößen, im Vergleich zu den Mischungen mit PEG40S, und multimodaler Größenverteilung (Pdi $\sim 0,5-0,7$). Es konnte auch mit keiner der anderen Mischungen eine monomodale Größenverteilung erreicht werden. Das Zetapotential der verschiedenen Lipid-Mischungen wies in allen Fällen einen negativen Wert auf, mit Ausnahme der DOTAP-Mischung, da DOTAP (1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan) ein stark positiv geladenes Lipid ist.

Für das Plaque-Targeting wurden mit Antikörper gekoppelte Liposomen hergestellt und deren Größe und Zetapotential sowie Morphologie (AFM) untersucht. Nach der Kopplung mit Antikörpern sollte der hydrodynamische Durchmesser der liposomalen Formulierungen um die Größe der Antikörper ansteigen. Tatsächlich jedoch fiel der Wert für DSPC/PEG40S/DPPE-CC von $189,5 \pm 60,2$ nm auf $185,8 \pm 37,1$ nm und für DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC von $193,3 \pm 19,1$ nm auf $185,3 \pm 60,7$ nm. Da der Pdi

~0,5 war, kam es vermutlich durch die vorliegende multimodale Größenverteilung zu diesem Ergebnis.

PLGA-Nanopartikel wurden benötigt, um ein Modellsystem zur Bestimmung elastischer Eigenschaften nanoskaliger Systeme zu entwickeln. Hierbei ging es um den Einfluss der Partikelgröße und der Lagerungsdauer auf das Elastizitätsmodul, welches in Kapitel 6 genauer dargestellt wird. Variationen in der Herstellung der PLGA-Nanopartikel führten zu dem gewünschten Ergebnis der reproduzierbaren Größensteuerung bei gleichzeitig sehr kleinem Pdi, der in keinem Fall über 0,2 lag. Somit waren die Partikelgrößen monomodal verteilt. Je niedriger die Rührgeschwindigkeit der Emulsion gewählt wurde, desto größer wurden die Nanopartikel. Die Durchmesser der Partikel stiegen kontinuierlich von $202,8 \pm 25,4$ nm auf $338,8 \pm 18,7$ nm. Diese Methode der Partikelgrößensteuerung wurde von Allémann *et al.*⁵³ übernommen, die neben der Rührgeschwindigkeit auch durch Variation der PVA-Menge die Partikelgröße steuern konnten.

Das kommerzielle Kontrastmittel SonoVue® diente sozusagen als „Goldstandard“ zum Vergleich der Ultraschallkontrastverstärkung der neuen, nanoskaligen Formulierungen. Die Größe der Bläschen von SonoVue® liegt im Mikrometerbereich und sie enthalten das lipophile Gas Schwefelhexafluorid, während im Vergleich die Bläschen der neuen Formulierungen deutlich kleiner als $1\text{ }\mu\text{m}$ sind und sie Luft als Gas enthielten, welche durch das Herstellungsverfahren (Beschallung an der Flüssigkeitsoberfläche mit Schaumbildung) in die Formulierungen eingebracht wurde. In der Produktinformation zu SonoVue® wird angegeben, dass der mittlere Durchmesser $2,5\text{ }\mu\text{m}$ ist, wobei 90 % kleiner als $6\text{ }\mu\text{m}$ groß sind und 99 % einen kleineren Durchmesser als $11\text{ }\mu\text{m}$ besitzen²⁵. Die Größenbestimmung mittels PCS gelang nicht, da die Formulierung sofort aufgrund des enthaltenen Schwefelhexafluorid flotierte. Die Cryo-TEM Aufnahme zeigte nur diffuse Strukturen und es wurde angenommen, dass die Mikrobubbles bei der Präparation im Vakuum geplatzt waren. Mit dem AFM gelang

es schließlich die Mikropartikel abzubilden und es konnte eine mittlere Größe von 1981 ± 822 nm gefunden werden. Die Form der Mikrobläschen war sehr uneinheitlich mit runden und teilweise länglichen Strukturen, die vermutlich durch Fusion entstanden waren.

Es gelang, mit zwei verschiedenen Herstellungsmethoden, nanoskalige liposomale Formulierungen zu entwickeln und diese mit Antikörpern zum Plaque-Targeting zu koppeln. Die Herstellungsmethode hatte weder einen Einfluss auf Größe noch auf die Polydispersität. Die Verwendung anderer Lipidmischungen erzielte ebenfalls Größen im Nanometerbereich mit multimodaler Größenverteilung. Ebenso war die Partikelgrößensteuerung der PLGA-Nanopartikel für die Elastizitätsmessungen erfolgreich.

KAPITEL 4: ULTRASCHALLKONTRASTMESSUNGEN

4. ULTRASCHALLKONTRASTMESSUNGEN

In diesem Kapitel werden die Ultraschallkontraststärken der in Kapitel 3 charakterisierten verschiedenen liposomalen Formulierungen präsentiert. Die Ultraschallkontrastverstärkung wurde als mittlerer Grauwert in Prozent bezogen auf den mittleren Grauwert von SonoVue® als Standard berechnet und am Tag der Herstellung bzw. Rekonstitution (Auflösen der Lyophilisate, um wieder eine Suspension zu erhalten) gemessen (wenn nicht anders angegeben). Der Einfluss der verschiedenen Herstellungsmethoden, durch gekoppelte Antikörper und durch das Medium im Flussmodell auf die Ultraschallkontrastintensität wird diskutiert.

4.1 ERGEBNISSE

4.1.1 VERSCHIEDENE HERSTELLUNGSMETHODEN

Abbildung 23 zeigt repräsentative Ultraschallbilder der ersten liposomalen Formulierungen (Phospholipon, DPPC/CH (70:30), DPPC/PEG40S (98:2 bzw. 91:9) und DSPC/PEG40S (98:2 bzw. 91:9)), die teilweise mit dem Ultraschallbad und teilweise mit dem Ultraschallstab hergestellt wurden, sowie Bilder des kommerziellen Kontrastmittel SonoVue®.

In Abbildung 23A ist die sehr helle und gleichmäßige Kontrastverstärkung durch SonoVue® zu sehen. Nach der Herstellung im Ultraschallbad waren bei den klassischen Phospholipon-Liposomen (Abbildung 23B) nur ein paar vereinzelte Bläschen zu erkennen, bei DPPC/CH (Abbildung 23C) war der Kontrast stärker. Heller und gleichmäßiger waren dagegen die Formulierungen DPPC/PEG40S (D1) und DSPC/PEG40S (E1) (je 98:2). Die Kontrastintensitäten der PEG40S-haltigen Formulierungen verbesserten sich bei Herstellung

mit dem Ultraschallstab deutlich, was in dem noch helleren und homogeneren Ultraschallbild in Abbildung D2 und E2 zu sehen ist. Eine Erhöhung der PEG40S-Menge von 2 mol% auf 9 mol% verstärkte den Kontrast nicht. Die Messungen wurden hierbei in doppelt destilliertem Wasser bzw., bei den PEG40S-haltigen Formulierungen, in TRIS-Albumin-Puffer durchgeführt. Über einen Zeitraum von fünf Minuten blieben die Kontrastintensitäten der nanoskaligen Formulierungen konstant, während die Kontraststärke von SonoVue® bereits nach zwei Minuten abnahm.

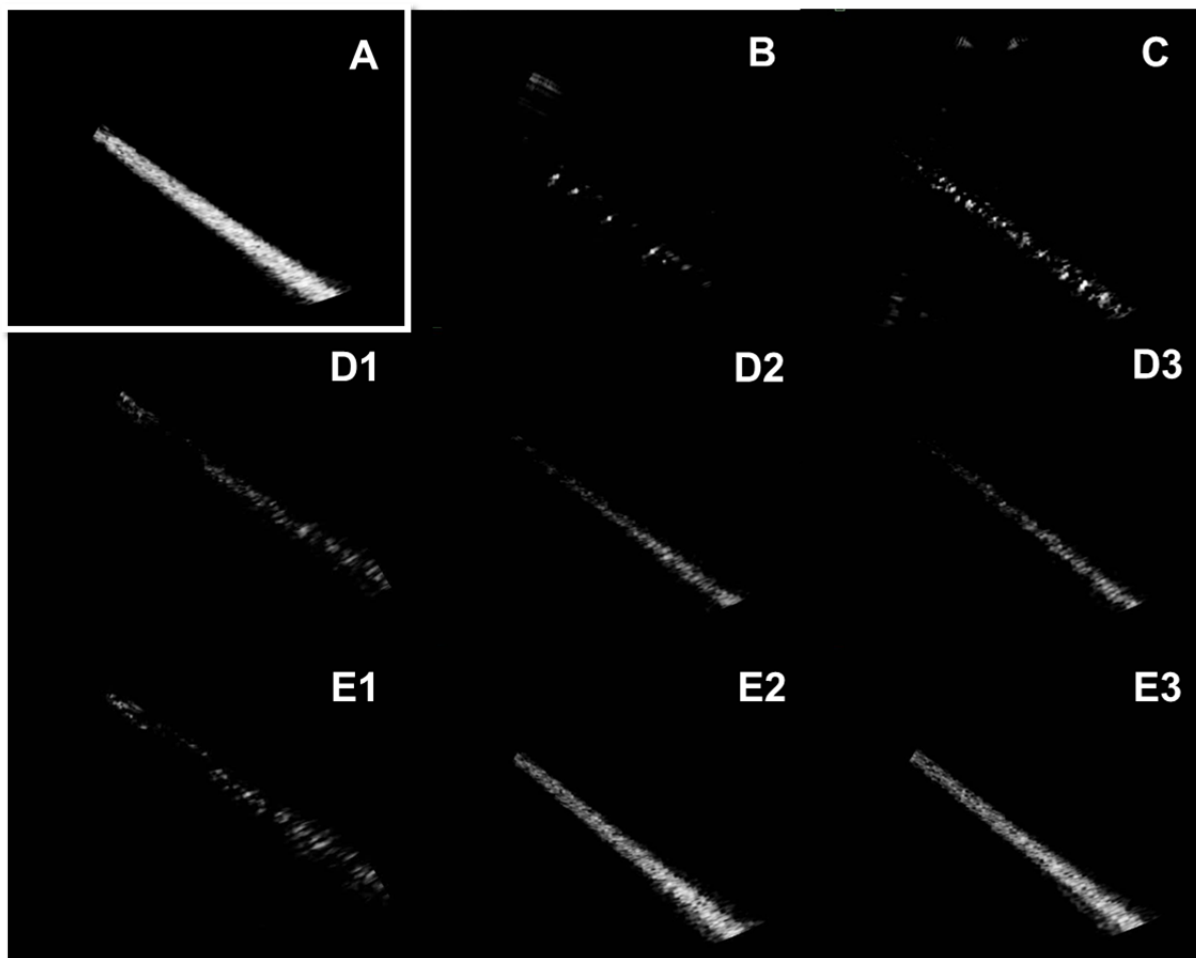


Abbildung 23: (A) SonoVue®; Ultraschallbild: (B) Phospholipon und (C) DPPC/CH₂, (D1) DPPC/PEG40S, (E1) DSPC/PEG40S; Ultraschallstab: (A2 bzw. 3) DPPC/PEG40S (98:2 bzw. 91:9), (B2 bzw. 3) DSPC/PEG40S (98:2 bzw. 91:9).

4.1.2 KOPPLUNG VON ANTIKÖRPERN

Für das Fibrin-Targeting wurden Liposomen mit gebundenen Antikörpern benötigt. Um Antikörper an ein Liposom zu koppeln, waren Linkerlipide nötig. Durch die Zumischung von Linkerlipiden zur Mischung DSPC/PEG40S und die Herstellung mit dem Ultraschallstab, konnte eine weitere Kontrastverbesserung erzielt werden. In Abbildung 24 sind repräsentative Ultraschallbilder der DSPC/PEG40S-Mischungen mit den Linkerlipiden DPPE-CC (Abbildung 24A1) und DSPE-PEG2000-CC (Abbildung 24B1) dargestellt. Nach der Kopplung von Antikörpern kam es zu einer leichten Reduzierung der Kontrastintensität. Siehe dazu auch Abbildung 24A2 und Abbildung 24B2. Diese Lipidmischungen wurden ins TRIS-Albumin-Puffer pH 7,4 untersucht. Die Kontrastverstärkung hielt über einen Zeitraum von mehreren Minuten an.

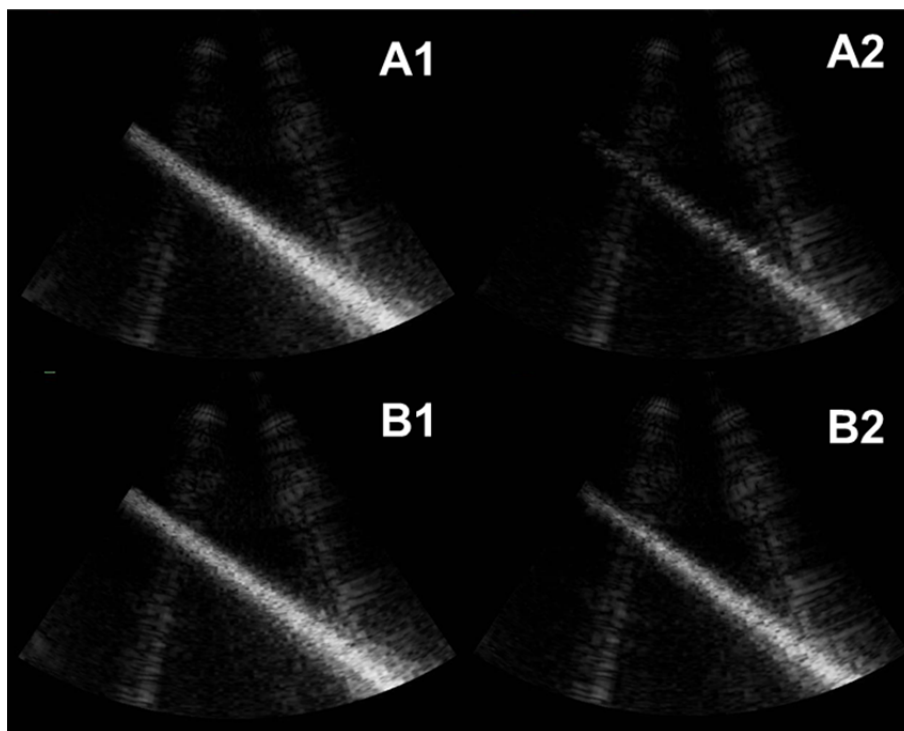


Abbildung 24: Ultraschallbilder der liposomalen Formulierungen, die Ankerlipide mit Antikörpern enthalten; (A1) DSPC/PEG40S/DPPE-CC, (A2) DSPC/PEG40S/DPPE-CC-AK, (B1) DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC, (B2) DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC-AK.

4.1.3 MITTLERE GRAUWERTE

In Abbildung 25 sind die Ultraschallkontrastintensitäten der verschiedenen Formulierungen, die mit unterschiedlichen Methoden hergestellt wurden, als mittlere Grauwerte berechnet, gezeigt.

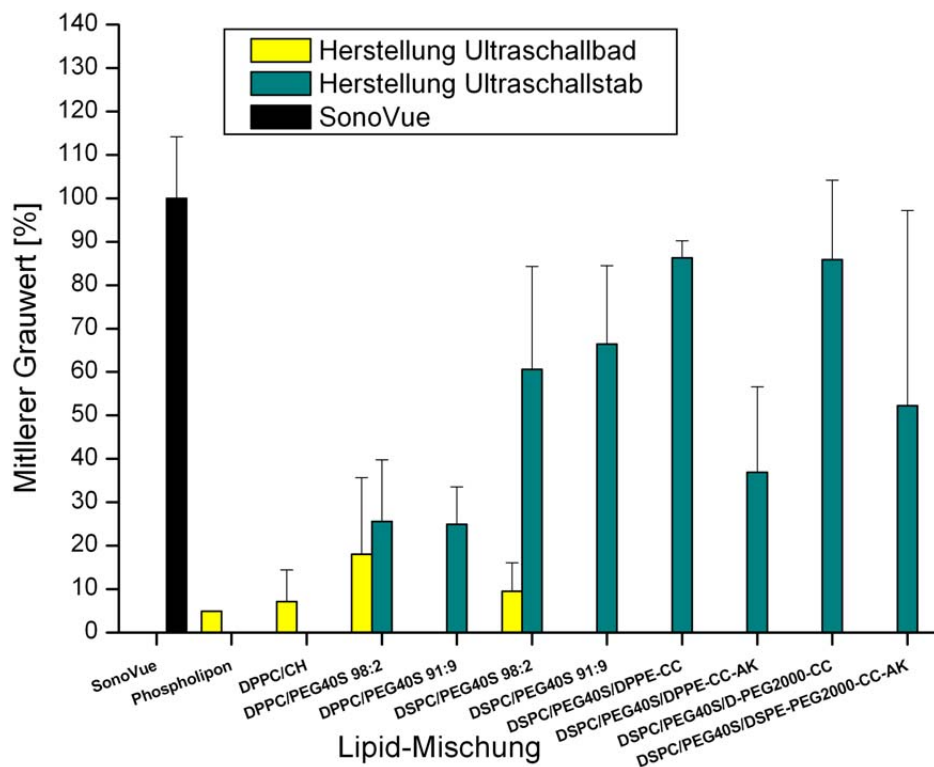


Abbildung 25: Grafische Darstellung der Ultraschallkontraste als mittlere Grauwerte der unterschiedlichen Lipid-Mischungen nach unterschiedlichen Herstellungsmethoden (s.a. Tabellen im Anhang).

Der Ultraschallkontrast des Kontrastmittels SonoVue® war hell und gleichmäßig mit einem mittleren Grauwert von $201,1 \pm 28,5$, was als 100 % gesetzt wurde. Der mittlere Grauwert der im Ultraschallbad hergestellten Liposomen war 4,9 % für Phospholipon und $7,1 \pm 7,3$ % für DPPC/CH. Bei den beiden anderen Mischungen (DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S) ergaben sich für die Herstellung mit dem Ultraschallstab größere mittlere Grauwerte, als für

die Herstellung im Ultraschall-Bad. Die Werte stiegen von $18 \pm 17,7 \%$ für DPPC/PEG40S und $9,5 \pm 6,6 \%$ für DSPC/PEG40S, bei Herstellung mit dem Ultraschallbad, auf $25,6 \pm 14,2 \%$ für DPPC/PEG40S und $60,6 \pm 23,7 \%$ für DSPC/PEG40S (je 98:2 mol%), bei Herstellung mit dem Ultraschallstab. Die Beimischung von Linkerlipiden zu den DSPC/PEG40S-Mischungen (91:9) erhöhte den mittleren Grauwert auf $86,3 \pm 3,9 \%$ für DSPC/PEG40S/DPPE-CC (91:9:10) und auf $85,9 \pm 18,3 \%$ für DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC (91:9:10). Die nachfolgende Kopplung von Antikörpern reduzierte die Kontrastverstärkung auf $36,9 \pm 19,7 \%$ (DPPE-CC-Linker) bzw. $52,2 \pm 45,0 \%$ (DSPE-PEG2000-CC-Linker).

4.1.4 MEDIUM

Da auch das Medium, in dem die Proben vermessen wurden, eine Rolle bei der Kontrastverstärkung gespielt haben könnte, wurden Messungen in doppelt destilliertem Wasser, in TRIS-Albumin Puffer pH 7,4 und 10 %iger FCS-Lösung (Fetal Calf Serum) miteinander verglichen. In Abbildung 26 ist zu sehen, dass das Medium die Kontrastverstärkung geringfügig beeinflusste.

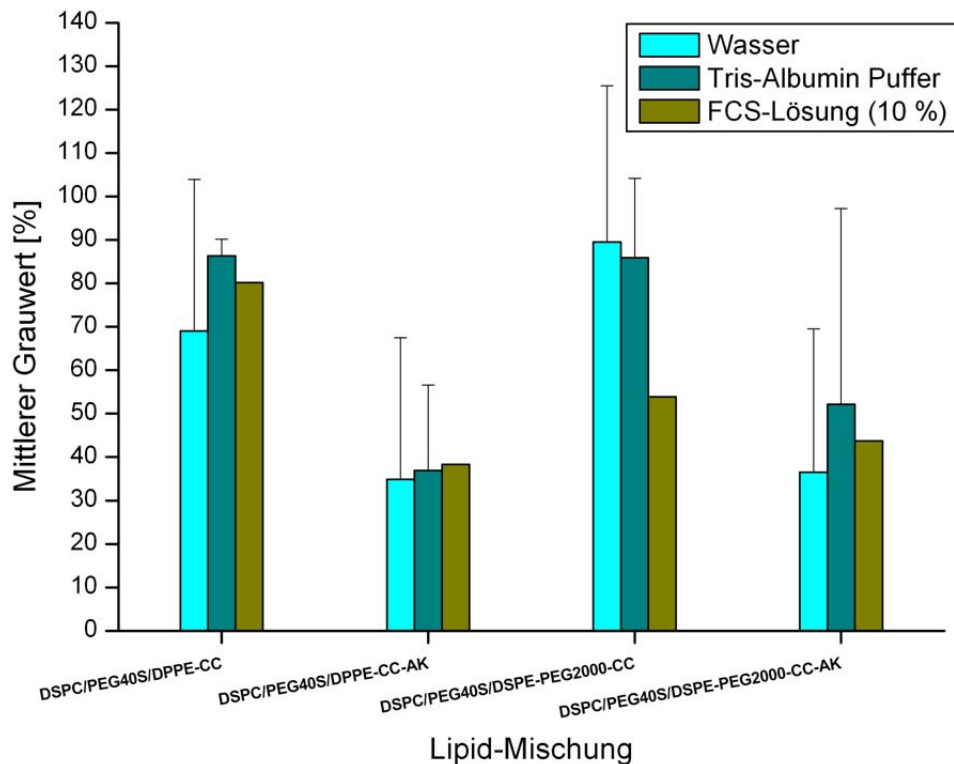


Abbildung 26: Ultraschallkontraste bei Messungen in verschiedenen Medien (SonoVue® entsprach 100%).

Im Vergleich zum TRIS-Puffer reduzierte sich der mittlere Grauwert von $86,3 \pm 3,9$ % der DSPC/PEG40S/DPPE-CC Formulierung in FCS-Lösung auf 80,2 % und in Wasser auf $69,0 \pm 34,9$ %. Für DSPC/PEG40S/DPPE-CC-AK stieg der Grauwert von $36,9 \pm 19,7$ % in FCS-Lösung auf 38,3 % und sank in Wasser auf $34,9 \pm 32,6$ % ab. Bei DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC sank der Grauwert von $85,9 \pm 18,3$ % in TRIS-Puffer auf 53,9 % in FCS-Lösung und erhöhte sich auf $89,5 \pm 36,0$ % in Wasser. Nach der Kopplung von Antikörpern an DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC reduzierte sich der mittlere Grauwert von $52,2 \pm 45,0$ % in TRIS-Puffer auf 43,7 % in FCS-Lösung und $36,5 \pm 33,0$ % in Wasser.

4.2 DISKUSSION

Die Verwendung von Ultraschallkontrastmitteln kann Ultraschalluntersuchungen und die Erstellung von Diagnosen erleichtern². Dazu benötigen die Kontrastmittel eine ausreichend lange Zirkulationszeit im Blut und angemessene Kontrastverstärkung, sowie eine sehr gute Bioverträglichkeit. Die lange Zirkulationszeit wird durch PEG-Ketten garantiert⁹³ und die Verwendung von Lipiden in verschiedenen Arzneimitteln bereits etabliert, bspw. im käuflich erhältlichen SonoVue®²⁵.

Die Ultraschallkontraststärke der neuen nanoskaligen, liposomalen Formulierungen wurde mit einem Flussmodell ermittelt. Solche Modelle nutzten auch schon von Smith *et al.*⁷⁸ und Cintas *et al.*⁹⁴, die jedoch Wasser statt Agar-Gel verwendeten und damit den Ultraschalleigenschaften von menschlichem Gewebe und Blutgefäßen keine Beachtung schenkten. Weiterentwickelte Systeme bauten Schumann *et al.*⁹⁵, die statt des Wassers ein Agar-Gel verwendeten, und Spengos *et al.*⁹⁶, die einen menschlichen Schädelknochen zwischen den Schallkopf und die Probe einbrachten. Diese beiden Systeme waren ebenfalls Durchflussmodelle.

Das in dieser Arbeit verwendete Flussmodell zur Untersuchung der Ultraschallkontrastverstärkung wurde nach Kollmann *et al.*⁶⁷ aufgebaut (s.Kapitel 2.2.1) und erlaubte durch die verwendeten Materialien eine Simulation der Bedingungen im menschlichen Körper (pH, Temperatur, (Blut-)Druck sowie Schalleigenschaften von Gewebe und Blutgefäßen).

Wie in Abbildung 23 und 25 zu sehen ist, war die Kontrastverstärkung der liposomalen Formulierungen, welche bei der Herstellung mit dem Ultraschallbad beschallt wurden, geringer als von SonoVue®, aber hell und deutlich zu erkennen. Wurden die Formulierungen nicht mit dem Ultraschallbad sondern dem Ultraschallstab beschallt, erhöhten sich die

mittleren Grauwerte bei DPPC/PEG40S (98:2) von $18,0 \pm 17,7 \%$ auf $25,6 \pm 14,2 \%$ und bei DSPC/PEG40S (98:2) von $9,5 \pm 6,6 \%$ auf $60,6 \pm 23,7 \%$. Die Ursache hierfür könnte gewesen sein, dass der Ultraschallstab die gesamte Ultraschallenergie über eine 2 mm-Spitze direkt in die Probe einbrachte, während im Ultraschallbad die Glaskolben in ein Volumen von ca. 1,5 Liter Wasser eintauchten, und die Ultraschallenergie neben dem Wasser zusätzlich die Barriere des Glaskolbens überwinden musste, ehe sie die Probe erreichte. Außerdem bringt die Beschallung mit dem Ultraschallstab an der Flüssigkeitsoberfläche viel Luft in die Formulierungen ein (Schaumbildung während der Beschallung und später beim Schütteln der Suspensionen)⁹⁷. Die enthaltene Luft führte zu einer erhöhten Ultraschallkontrastintensität. Die nanoskaligen, liposmalen Ultraschallkontrastmittel erwiesen sich mit einer Zirkulationszeit von mehr als fünf Minuten im Flussmodell dem kommerziellen Kontrastmittel SonoVue®, welches im Flussmodell nur eine zweiminütige Zirkulationsdauer zeigte, als überlegen. Erwartet worden war eine kürzere Zirkulationsdauer der neuen Formulierungen, da diese Luft enthielten, welche als ein gut wasserlösliches Gas schnell aus der Formulierung in die umgebende Flüssigkeit diffundieren sollte, während SonoVue® das wasserunlösliche Gas Schwefelhexafluorid enthielt, welches länger in den Bläschen verweilen und die Kontrastverstärkung länger aufrecht erhalten sollte.

Eine Erhöhung der Menge von PEG40S von 2 mol% auf 9 mol% erzielte bei DPPC/PEG40S einen vergleichbaren Grauwert, jedoch mit einer kleineren Standardabweichung ($25,6 \pm 14,2 \%$ für DPPC/PEG40S (98:2) und $24,9 \pm 8,6 \%$ für DPPC/PEG40S (91:9)). Bei DSPC/PEG40S stieg der Grauwert von $60,6 \pm 23,7 \%$ auf $66,4 \pm 18,1 \%$ durch Erhöhung der PEG40S-Menge. Bei Betrachtung der Ergebnisse aus Kapitel 3 und Kapitel 4 lässt sich mutmaßen, dass für einen guten Ultraschallkontrast nicht nur die Zusammensetzung der liposmalen Formulierungen eine Rolle spielt, sondern auch das Verhältnis von Liposomen zu Mizellen für eine starke und gleichmäßige Ultraschallkontrastverstärkung entscheidend

sein kann. Eine Erhöhung der PEG40S-Menge könnte die Anzahl von Mizellen in den getesteten Formulierungen steigern. Johnsson *et al.*⁸⁴ stellten fest, dass eine Erhöhung der PEG-Lipid-Menge (DSPE/PEG2000 oder DSPE/PEG5000 oder DPPE/PEG5000) von 4,5 mol% bis zu 68 mol% zunächst zu kontinuierlich mehr diskoidalen Mizellen, bei immer kleiner werdenden Durchmessern der runden Vesikel, führte, bis schließlich nur noch runde Mizellen vorhanden waren. Eine größere Menge Mizellen scheint die Ultraschallkontrastintensität zu erhöhen.

Die DSPC/PEG40S Formulierung, mit dem molaren Verhältnis 91:9 mol% und der Herstellung mit dem Ultraschallstab, erwies sich im Experiment als der beste Kontrastverstärker, und wurde daher für die Experimente zum Plaque-Targeting verwendet. Um Antikörper an die Formulierung binden zu können, mussten Linkerlipide verwendet werden. Das Linkerlipid DPPE-CC band den Antikörper direkt an die Oberfläche. Das Linkerlipid DSPE-PEG2000-CC enthielt einen PEG-Spacer, der den Antikörper weit von der Oberfläche entfernt hielt. Die Cyanurchlorid-Gruppe verknüpfte den Antikörper mit den liposomalen Formulierungen. Durch die Beimischung der Linkerlipide kam es zu einem Kontrastanstieg von $66,4 \pm 18,1 \%$ auf $69,0 \pm 34,9 \%$ im Falle von DPPE-CC und auf $89,5 \pm 36,0 \%$ im Falle von DSPE-PEG2000-CC. Nach der Kopplung mit Antikörpern sank der Grauwert etwas ab auf $34,9 \pm 32,6 \%$ bei DPPE-CC bzw. auf $36,5 \pm 33,0 \%$ bei DSPE-PEG2000-CC. Siehe dazu Abbildung 25. Die genannten Werte wurden bei der Messung in Wasser ermittelt. Aber auch in TRIS-Albumin Puffer und in 10 %iger FCS-Lösung wurden nach der Antikörperkopplung abgeschwächte Werte erhalten, was auch in Abbildung 26 zu sehen ist. Die Abschwächung der Kontrastintensität könnte durch eine Abschirmung der Liposomen gegen den Ultraschall, durch die gekoppelten Antikörper, die die Oberfläche aufgrund ihrer, im Verhältnis zum Liposom, großen Größe abschirmen könnten, verursacht worden sein. Auch Tiukinhoy-Laing *et al.*⁹ fanden einen kleineren mittleren Grauwert für mit

tPA (Gewebeplasminogenaktivator)-gekoppelten liposomalen Ultraschallkontrastmitteln im Vergleich zu den nicht-gekoppelten Liposomen. Die Kontrastverstärkung der mit Antifibrin gekoppelten liposomalen Formulierungen war jedoch ausreichend hoch, um ein erfolgreiches Targeting zu garantieren.

In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass Plasmaproteine wenig Einfluss auf die Kontraststärke hatten. Selbst in FCS zeigten alle Formulierungen sehr gute Kontraststärken, mit Ausnahme von DSPC/PEG40S/DSPE-PEG200-CC, welches in FCS eine Kontrastabschwächung auf 53,9 % aufwies, im Vergleich zum Grauwert in Wasser ($89,5 \pm 36,0$ %). Nach der Kopplung mit Antikörpern, gab es nur noch einen sehr schwachen Unterschied zwischen den verschiedenen Medien in Bezug auf Kontraststärke. Die Ultraschallkontraststabilität der Formulierungen ließ sich auf das enthaltende PEG40S zurückführen, da die PEG-Ketten auf der Oberfläche eine Proteinanheftung an die Oberfläche verhindern^{98,99}.

Zusammenfassend konnte bei der Herstellung der liposomalen Ultraschallkontrastmittel mit dem Ultraschallbad bereits eine sichtbare Kontrastverstärkung erreicht werden, welche durch die Verwendung eines Ultraschallstabes deutlich gesteigert werden konnte. Die Erhöhung der PEG40S-Konzentration (Herstellung mit dem Ultraschallstab) erzielte nochmals höhere mittlere Grauwerte. Die höchsten Grauwerte wurden durch Zusatz der Ankerlipide DPPE-CC und DSPE/PEG2000-CC zur DSPC/PEG40S-Formulierung (91:9) erreicht, welche nach der Kopplung der Antifibrin Antikörper wieder etwas sanken. Die Zirkulationszeit der neuen, liposomalen Formulierungen war zudem der von SonoVue® deutlich überlegen. Außerdem beeinflusste das Vorhandensein von Proteinen die Ultraschallkontrastverstärkung der liposomalen Ultraschallkontrastmittel nur wenig. Somit war es möglich liposomale Ultraschallkontrastmittel zu entwickeln, deren Größen im Nanometerbereich lagen und die allein mit der enthaltenen Luft eine starke und langanhaltende Kontrastverstärkung bewirken konnten und erweisen sich damit dem kommerziellen SonoVue®, dessen Größe der Bläschen

im Mikrometerbereich liegen und das das wasserunlösliche Schwefelhexafluorid zur Kontrastverstärkung beinhaltet, als ebenbürtig.

KAPITEL 5: VERBESSERUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES

5. VERBESSERUNG DES ULTRASCHALLKONTRASTES

In den Kapiteln 3 und 4 wurde der Einfluss von Lipidmischung, und dem daraus resultierenden Mizellen-Liposom-Verhältnis, auf die Ultraschallkontrastverstärkung untersucht. Im folgenden Kapitel werden nun die Ergebnisse zu den Versuchen, den Ultraschallkontrast weiter zu verbessern, vorgestellt. Hierbei wurden Variationen beim Herstellungsverfahren, verschiedene Lipidmischungen und der Einfluss des Gefriertrocknens genauer untersucht.

5.1 ERGEBNISSE

5.1.1 HERSTELLUNGSMETHODEN

Methode A):

Der einfachste Weg die Ultraschallkontrastmittel herzustellen, war die Herstellung im Ultraschallbad. Die beiden unterschiedlichen Lipidfilme (DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S je 91:9 mol%) wurden im Ultraschallbad für eine Stunde bei 65 °C inkubiert und anschließend für 1, 2, 3, 4 oder 5 Minuten beschallt.

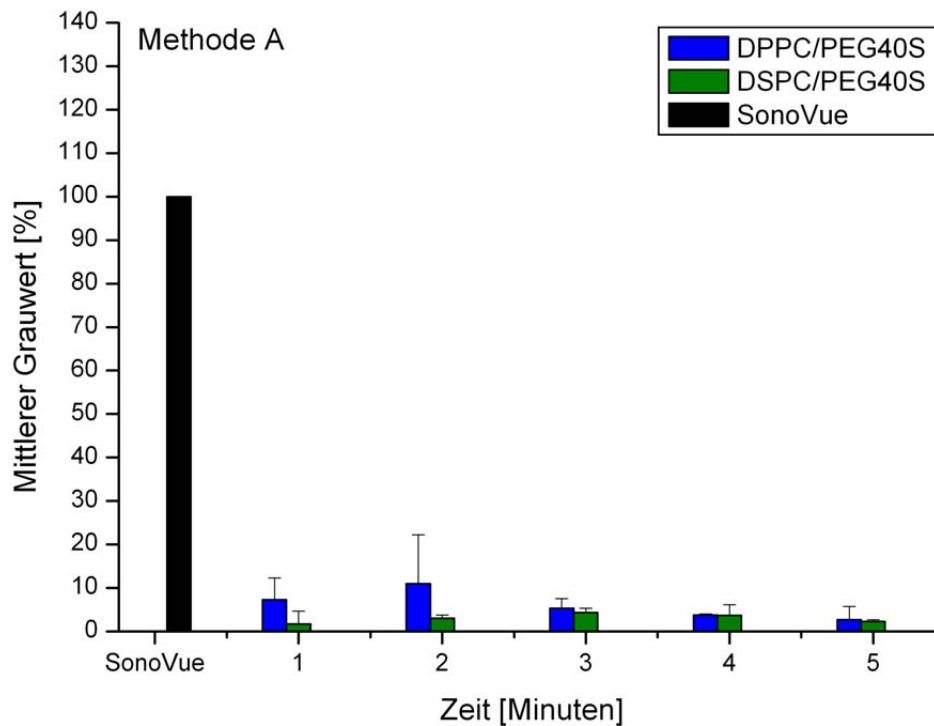


Abbildung 27: Ultraschallkontraste nach Herstellung mit dem Ultraschallbad.

Das Fluss-Modell zeigte nur schwach erkennbare Kontrastverstärkung. Das beste Ergebnis für DPPC/PEG40S wurde bei Beschallung für 1 und 2 Minuten erzielt ($7,28 \pm 4,99 \%$ und $11,01 \pm 11,18 \%$), allerdings mit hohen Standardabweichungen. Längere Beschallung führte zu einer Abschwächung der Ultraschallkontrastintensität, bei gleichzeitiger Verringerung der Standardabweichung. Der beste Wert für DSPC/PEG40S lag bei $4,32 \pm 1,03 \%$, welcher mit dreiminütiger Beschallung erzielt wurde. DSPC/PEG40S und DPPC/PEG40S zeigten bei Beschallung für 3, 4 und 5 Minuten die gleichen Ergebnisse mit 4 - 5 %, 3,7 % und ~2,5 % (s. Tabelle im Anhang). Wie in Abbildung 27 deutlich zu erkennen ist, waren die mittleren Grauwerte aller Lipidmischungen deutlich niedriger als der Grauwert von SonoVue®.

Methode B):

Bei dieser Methode wurden die Proben nach dem einstündigen Inkubieren mit dem Ultraschallstab im warmen Wasserbad behandelt. Zunächst erfolgte eine dreiminütige Beschallung mit dem Ultraschallstab, nahe am Boden des Kolbens, mit konstantem Ultraschall bei drei verschiedenen Amplituden (10, 30 und 50 %) und anschließend wurde der Stab nahe an die Oberfläche der Flüssigkeit gebracht und diese für 10, 20, 30 und 40 Sekunden mit 97 % Amplitude (maximale Amplitude) und gepulstem Ultraschall (20 %) beschallt.

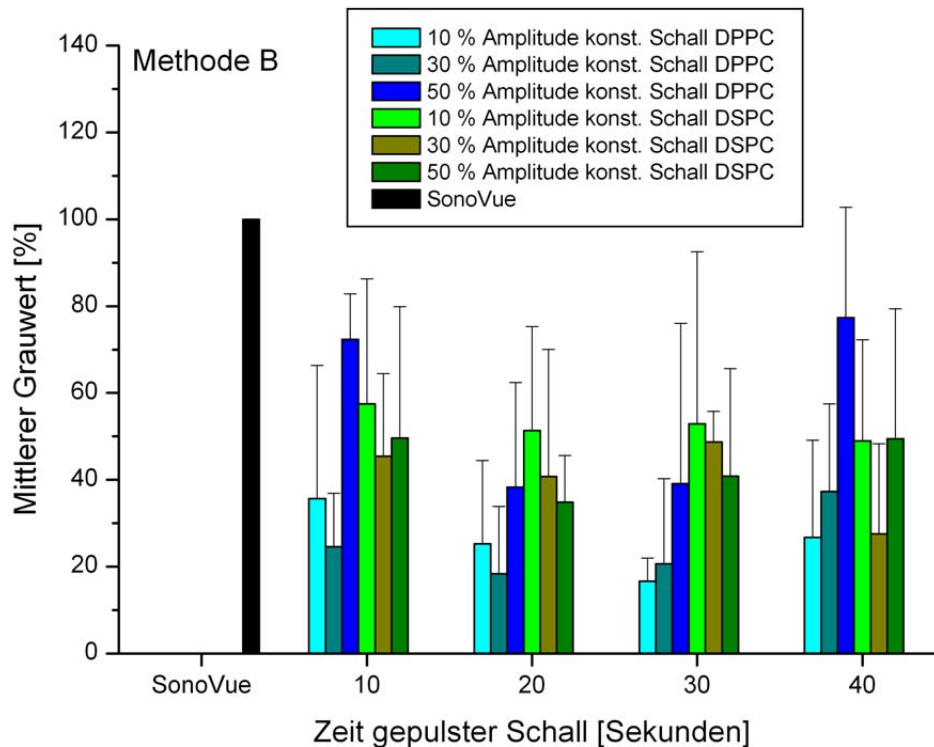


Abbildung 28: Ultraschallkontraste nach Herstellung mit dem Ultraschallstab (Methode B), bei verschiedenen Amplituden der konstanten Schallabgabe und verschiedenen Beschallungszeiten des gepulsten Ultraschalls.

Bei der DPPC/PEG40S Formulierung konnten die größten mittleren Grauwerte bei konstantem Ultraschall nahe des Kolbenbodens mit 50 % Amplitude, gefolgt von 10 Sekunden bzw. 40 Sekunden gepulstem Ultraschall, nahe an der Flüssigkeitsoberfläche erreicht werden. Die Maximalwerte lagen bei $72,35 \pm 10,48 \%$ bzw. $77,33 \pm 24,45 \%$. Den niedrigsten Grauwert von $16,66 \pm 5,27 \%$ erzielte die Herstellung mit konstantem Schall mit 10 % Amplitude gefolgt von 30 Sekunden gepulstem Ultraschall. Abbildung 28 zeigt, dass 10 Sekunden bzw. 40 Sekunden Beschallung, mit gepulstem Schall, größere Grauwerte erzielten, als 20 bzw. 30 Sekunden gepulster Ultraschall, egal mit welcher Amplitude die konstante Beschallung nahe am Boden des Kolbens durchgeführt wurde.

Bei der DSPC/PEG40S Formulierung konnte der höchste Grauwert mit ($57,45 \pm 28,81 \%$) mit 10 % Amplitude (konstanter Schall) und 10 Sekunden gepulster Schall erreicht werden. Der kleinste mittlere Grauwert wurde mit 30 % Amplitude (konstanter Schall) und 40 Sekunden gepulster Beschallung erzielt ($27,54 \pm 20,79 \%$). Siehe dazu auch Abbildung 28 sowie Tabelle im Anhang.

5.1.2 LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Veränderungen der Lipidzusammensetzung können ebenfalls einen Einfluss auf die Kontrastverstärkung haben. Deshalb wurde die Ultraschallkontrastverstärkung verschiedener Lipidmischungen untersucht.

Dazu wurden 2, 5 und 10 mol% Tetraetherlipide (TEL) bzw. 10 mol% DPPE zu den ersten Lipidmischungen (DPPC/CH, DPPC/PEG40S (98:2), DSPC/PEG40S (98:2)) gegeben. Weitere Mischungen waren DPPC/DPPE-MPEG5000 und DSPC/DPPE-MPEG5000 (je 91:9) sowie DMPC/PEG40S, DPPE/PEG40S, DPPG/PEG40S und DOTAP/PEG40S (je 98:2 und 91:9). Die mittleren Grauwerte sind in Abbildung 29 zusammengestellt.

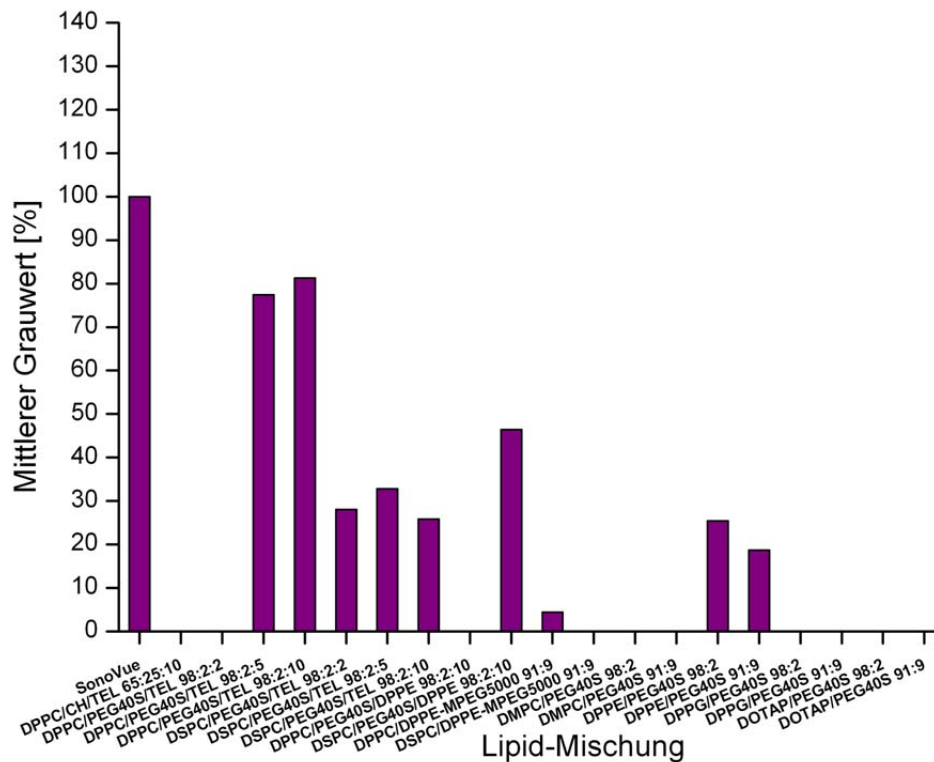


Abbildung 29: Darstellung des Ultraschallkontrastes verschiedener Lipidmischungen im Vergleich zu SonoVue ® (s.a. Tabelle im Anhang).

DPPC/CH/TEL (65:25:10), DPPC/PEG40S/TEL (98:2:2), DSPC/DPPE-MPEG5000 (91:9), DPPC/PEG40S/DPPE (98:2:10), DMPC/PEG40S (98:2 und 91:9), DPPG/PEG40S (98:2 und 91:9) sowie DOTAP/PEG40S (98:2 und 91:9) zeigten keinen Ultraschallkontrast. Die geringste Kontrastverstärkung zeigte DPPC/DPPE-MPEG5000 (91:9) mit 4,4 %. Darauf folgen DPPE/PEG40S (91:9) mit 18,7 %, DPPE/PEG40S (98:2) mit 18,7 %, DSPC/PEG40S/TEL (98:2:10) mit 25,8 % und DSPC/PEG40S/TEL (98:2:2) mit 28,0 %. Werte über 30 % erreichten DSPC/PEG40S/TEL (98:2:5) (32,8 %) und DSPC/PEG40S/DPPE (98:2:10) (46,4 %). Die besten Ergebnisse wurden mit DPPC/PEG40S/TEL mit den molaren Verhältnissen 98:2:5 und 98:2:10 erzielt, mit den mittleren Grauwerten 77,4 % und 81,3 %.

5.1.3 GEFRIERTROCKNEN

Auch der Einfluss des Gefriertrocknens auf die Ultraschallkontrastverstärkung wurde untersucht. Von den hergestellten Proben wurde eine bestimmte Menge entnommen, lyophilisiert und die Ultraschallkontraste sofort nach dem Rekonstituieren der Lyophilisate bestimmt. SonoVue® ist ebenfalls als gefriergetrocknetes Pulver auf dem Markt.

Bei Herstellung der Formulierungen mit dem Ultraschallbad war bei der DPPC/PEG40S Formulierung nach dem Gefriertrocknen eine deutliche Erhöhung der mittleren Grauwerte zu beobachten (s.a. Abbildung 30).

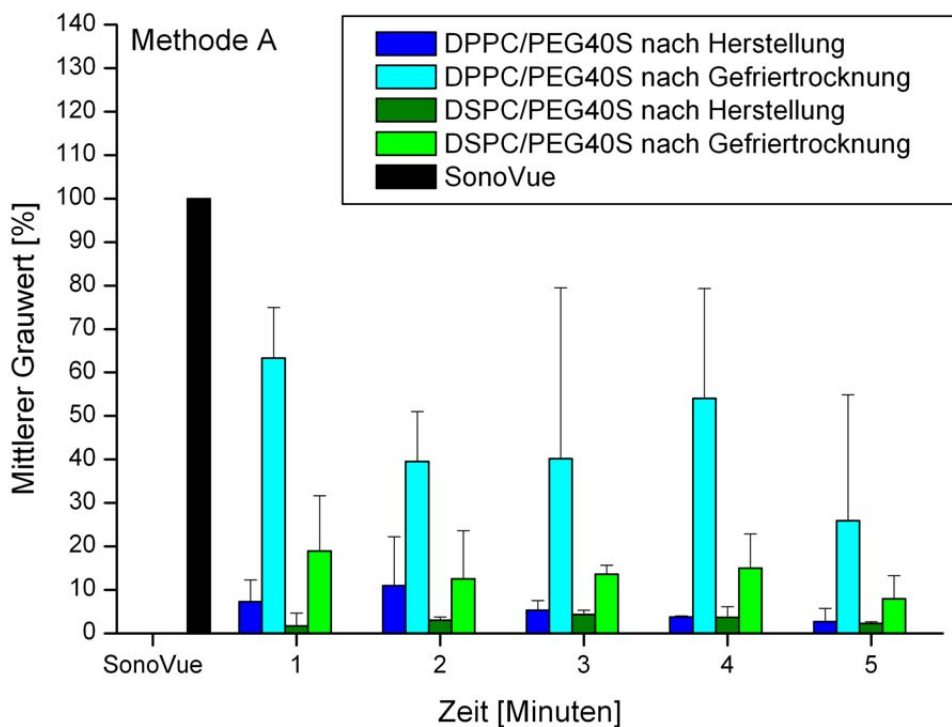


Abbildung 30: Vergleich der Ultraschallkontrastverstärkung vor und nach dem Gefriertrocknen. (Methode A in Kapitel 5.1.1.)

Zuvor lagen die Werte bei $\max. 11,01 \pm 11,18 \%$, bei Beschallung für zwei Minuten, nach dem Gefriertrocknen stieg die Kontrastintensität auf $\min. 25,88 \pm 28,96 \%$, bei Beschallung

für fünf Minuten, und im besten Fall sogar auf $63,32 \pm 11,63 \%$, bei Beschallung im Ultraschallbad für eine Minute. Die DSPC/PEG40S Formulierung zeigte ebenfalls eine starke Erhöhung der Kontrastintensität nach dem Gefriertrocknen, allerdings war hier der Maximalwert $18,9 \pm 12,78 \%$, bei Beschallung für eine Minute. Aber auch der Minimalwert ($7,97 \pm 5,28 \%$) dieser Messung überstieg den Maximalwert von vor dem Gefriertrocknen ($4,32 \pm 1,03 \%$) um ungefähr das Doppelte.

Wurden die Formulierungen mit dem Ultraschallstab statt mit dem Ultraschallbad hergestellt, ergaben sich bereits für die frisch hergestellten Suspensionen sehr hohe Kontrastintensitäten.

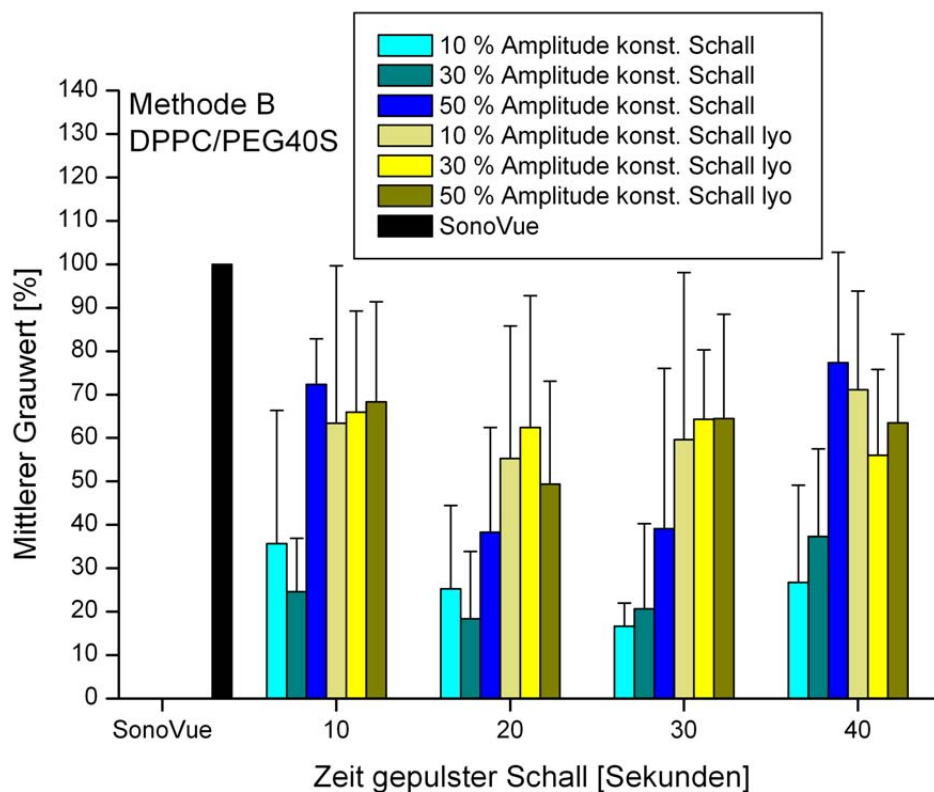


Abbildung 31: DPPC/PEG40S-Formulierung vor und nach dem Gefriertrocknen im direkten Vergleich (Methode B in Kapitel 5.1.1).

Bei der DPPC/PEG40S Formulierung ergab sich für beinahe alle Variationen der Herstellungsmethode, nach dem Lyophilisieren, eine deutliche Kontrastverbesserung. Dies ist

in Abbildung 31 gut zu sehen, in der, wieder zum besseren Vergleich, die mittleren Grauwerte der Mischungen vor dem Gefriertrocknen mit eingefügt wurden. Der geringste Grauwert nach dem Gefriertrocknen war $49,33 \pm 23,76 \%$, bei 50 % Amplitude (konstanter Schall) und 20 Sekunden gepulstem Schall. Der höchste Grauwert war $71,07 \pm 22,74 \%$, bei 10 % Amplitude (konstanter Schall) und 40 Sekunden gepulstem Schall. Nach dem Lyophilisieren lagen die mittleren Grauwerte alle in einem Bereich von $\sim 50 - \sim 71 \%$, unabhängig von der Amplitude des konstanten Schalls oder der Beschallungsdauer des gepulsten Schalls. Alle Grauwerte, mit Ausnahme der Beschallung mit 50 % Amplitude konstantem Schall gefolgt von 10 bzw. 40 Sekunden gepulstem Schall, überstiegen nach dem Lyophilisieren diejenigen von vor dem Gefriertrocknen. Zu den genauen Grauwerten siehe Tabelle im Anhang.

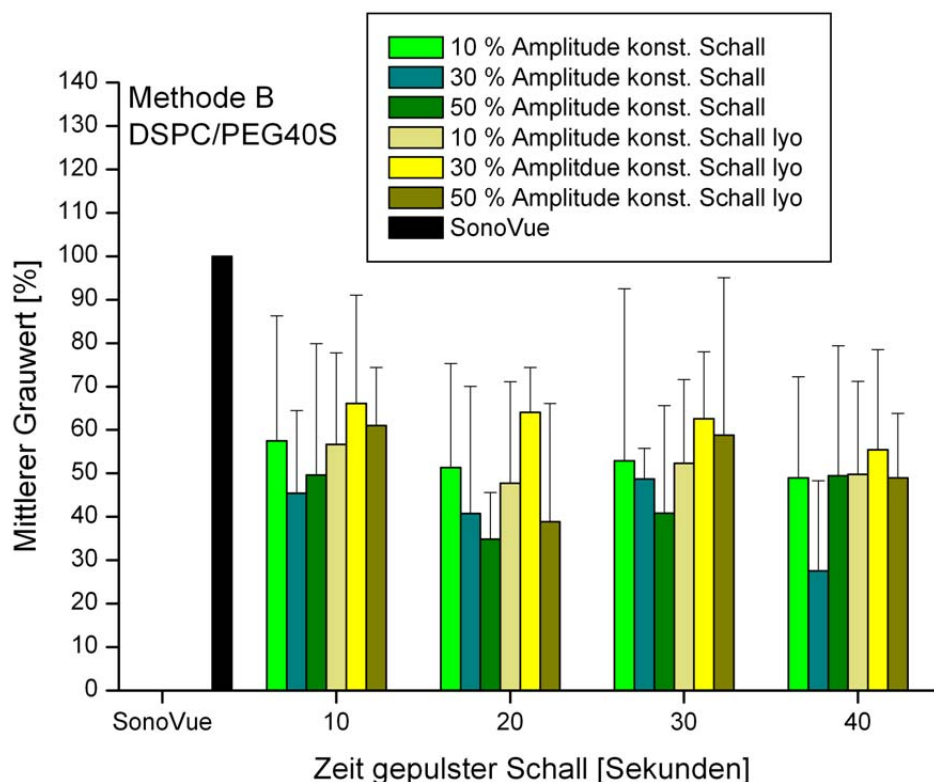


Abbildung 32: DSPC/PEG40S Formulierung vor und nach dem Gefriertrocknen im direkten Vergleich (Methode B in Kapitel 5.1.1).

In Abbildung 32 sind die Kontrastintensitäten der DSPC/PEG40S Formulierung vor und nach dem Lyophilisieren gegenüber gestellt. Der niedrigste Grauwert nach dem Lyophilisieren war $38,84 \pm 27,28 \%$, bei 50 5 Amplitude konstanter Schall gefolgt von 20 Sekunden gepulstem Schall. Der höchste Grauwert konnte mit 30 % Amplitude (konstanter Schall) und 10 Sekunden gepulstem Schall erzielt werden ($66,12 \pm 24,94 \%$). Bei jeder Variation der Herstellungsmethode, war nach dem Gefriertrocknen entweder ein annähernd gleich bleibender Grauwert (minimale Verringerung) oder eine Erhöhung der mittleren Grauwerte zu sehen. Zu den genauen Grauwerten siehe Tabelle im Anhang.

Abbildung 33 zeigt die mittleren Grauwerte verschiedener Lipidmischungen vor und nach dem Lyophilisieren (siehe dazu Kapitel 4 Abbildung 25 und Kapitel 5 Abbildung 29).

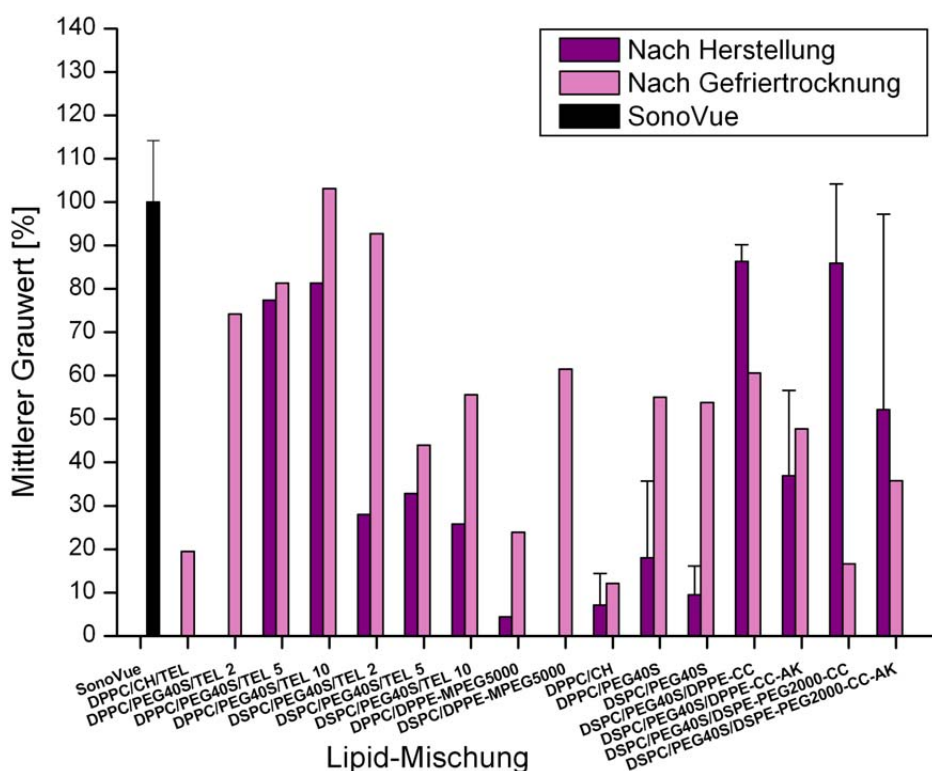


Abbildung 33: Vergleich zwischen Ultraschallkontrastintensitäten der frisch hergestellten Mischungen und nach dem Gefriertrocknen (bei den Mischungen ohne Fehlerbalken wurde nur jeweils eine Probe vermessen) (s.a. Tabelle im Anhang).

Nach dem Gefriertrocknen überstieg beinahe bei jeder Lipidmischung der mittlere Grauwert die Grauwerte der Lipidmischungen vor dem Gefriertrocknen. DPPC/PEG40S/TEL (98:2:10) erzielte nach dem Gefriertrocknen mit 103,1 % einen höheren Grauwert als SonoVue®. DPPC/CH/TEL, DPPC/PEG40S/TEL (98:2:2) und DSPC/DPPE-MPEG5000 (91:9) zeigten vor dem Gefriertrocknen so gut wie keinen Kontrast. Nach dem Lyophilisieren konnte jedoch eine Kontrastverstärkung von 19,5 %, 74,2 % und 61,5 % festgestellt werden. Bei DSPC/PEG40S/DPPE-CC, DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC und DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC-AK sank der mittlere Grauwert nach dem Lyophilisieren stark ab, von $86,3 \pm 3,9$ % auf 60,6 % bzw. von $85,9 \pm 18,3$ % auf 16,6 % bzw. von $52,2 \pm 45,0$ % auf 35,8 %. Bei DPPC/CH veränderte sich der mittlere Grauwert durch das Gefriertrocknen kaum.

5.2 DISKUSSION

Da in Kapitel 4 bei der Messung der Ultraschallkontrastverstärkung bereits gezeigt wurde, dass unterschiedliche Herstellungsmethoden, unterschiedliche Zusammensetzung der Lipidmischung und auch Gefriertrocknung einen Einfluss auf die Kontrastintensität hatten, wurden diese Zusammenhänge, in einer breiter angelegten Experimentalreihe, genauer untersucht.

Variationen bei der Herstellung der beiden Mischungen, DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S, im molaren Verhältnis 91:9 waren hierbei von besonderem Interesse.

Die Verwendung des Ultraschallbades zur Herstellung der Kontrastmittel erbrachte geringe Kontrastintensitäten. Das durchgeführte Experiment mit unterschiedlich langen Beschallungszeiten führte mit keiner der beiden Lipidmischungen zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Ein maximaler Grauwert von $11,01 \pm 11,18 \%$ wurde für DPPC/PEG40S mit zwei Minuten Beschallungszeit und ein maximaler Grauwert von $4,32 \pm 1,03 \%$ für DSPC/PEG40S nach drei Minuten Beschallung erzielt. Die Grundlage zur Herstellung der liposomalen Formulierungen mit dem Ultraschallstab basierte auf Kim *et al.*⁹⁷. Sie mischten verschiedene Lipide, u.a. DSPC, mit PEG40S im molaren Verhältnis 91:9 und erhielten eine Mischung von verschiedenen Liposomengrößen zwischen 200 nm und mehreren μm . Nur die größeren Liposomen waren interessant und man trennte diese für weitere Experimente von den kleineren ab. Die bei uns angewandte Variante unterschied sich von der in der Literaturquelle, in der Verwendung von gepulstem Schall bei Beschallung nahe an der Flüssigkeitsoberfläche und der Verwendung einer kleineren Spitze am Ultraschallstab (in der Literatur konstanter Ultraschall nahe an der Flüssigkeitsoberfläche mit einer 12,5 mm-Spitze⁹⁷). Außerdem erwärmte der verwendete Ultraschallstab die Proben nicht während der konstanten Beschallung, was bei Kim *et al.* jedoch beschrieben wurde⁹⁷, sodass die Lipidmischungen für das Experiment in einem Wasserbad auf 65 °C erwärmt werden

mussten, damit die Phasenübergangstemperatur überschritten werden konnte, was für die Herstellung von liposomalen Formulierungen entscheidend ist. Es wurde ebenfalls eine multimodale Größenverteilung erhalten, jedoch mit kleineren Größen, die sich auf zwei Fraktionen aufteilten (70 nm und 200-300 nm) (s.a. Kapitel 3). Die Ergebnisse der Ultraschallkontrastverstärkung fielen nun deutlich besser aus, als bei Herstellung mit dem Ultraschallbad. Grauwerte zwischen $16,66 \pm 5,27 \%$ und $77,33 \pm 24,45 \%$ für DPPC/PEG40S und Grauwerte zwischen $27,54 \pm 20,79 \%$ und $57,45 \pm 28,81 \%$ für DSPC/PEG40S wurden für die verschiedenen Einstellungen (unterschiedliche Amplituden und Beschallungszeiten) erhalten. Die DSPC/PEG40S Formulierung zeigt sich, bei beinahe bei jeder Variation der Einstellungen der DPPC/PEG40S Formulierung überlegen. Nur bei 50 % Amplitude des konstanten Schalls und 10 und 40 Sekunden Beschallung mit gepulstem Schall übertraf die DPPC/PEG40S Formulierung die DSPC/PEG40S Formulierung. Der Grund für die ultraschallkontrastverstärkenden Eigenschaften der liposomalen Formulierungen wird in der bei diesem Verfahren nachweislich mit dem Ultraschallstab eingearbeiteten Luft vermutet (Schaumbildung beim Beaschallen) ⁹⁷. Die sehr niedrigen Grauwerte bei Beschallung im Ultraschallbad waren vermutlich darauf zurück zu führen, dass nicht genügend Luft in die liposomalen Formulierungen eingebracht werden konnte, da auch nur eine geringe Schaumbildung während der Beschallung zu erkennen war.

Die Verwendung verschiedener Lipidmischungen sollte zeigen, welche weiteren Mischungen als Kontrastmittel verwendet werden können. Dabei kristallisierten sich besonders die Tetraetherlipidzusätze heraus. Tetraetherlipide sind Lipide, die aus Archaeobakterien (*Thermoplasma Acidophilum*) gewonnen werden. Das sind Bakterien, deren optimale Lebensbedingungen eine Temperatur von 56 °C und ein pH von zwei sind ¹⁰⁰. Die besondere, cyclische Struktur mit den vier Etherbindungen, der aus den Bakterien gewonnen Tetraetherlipide (TEL), macht, aus ihnen hergestellte Liposomen, physikalisch und chemisch

wesentlich stabiler, als klassische Liposomen¹⁰¹. Die DPPC/PEG40S/TEL-Mischungen erwiesen sich hier den DSPC/PEG40S/TEL-Mischungen überlegen.

SonoVue® wurde bei allen Experimenten als Vergleichsstandard verwendet. Da es als gefriergetrocknetes Pulver auf dem Markt ist, war es interessant zu überprüfen, ob auch die DPPC/PEG40S und die DSPC/PEG40S Mischungen ein verändertes Ultraschallverhalten nach dem Gefriertrocknen aufweisen. Die Mischungen wurden ohne zusätzliches Cryo-Schutzmittel lyophilisiert, da die langen PEG-Ketten, die bereits in der Mischung enthalten waren, ausreichend Schutz bieten sollten und zusätzlich konnte dadurch auf unnötige Zusatzsubstanzen verzichtet werden. Die Ultraschallkontrastmessungen der gefriergetrockneten Mischungen zeigte, dass die Kontrastintensität der im Ultraschallbad hergestellten Formulierungen deutlich anstieg und Grauwerte zwischen $25,88 \pm 28,96$ % und $63,32 \pm 11,63$ % für die DPPC/PEG40S Formulierung und Werte zwischen $7,97 \pm 5,28$ % und $18,9 \pm 12,78$ % für die DSPC/PEG40S Formulierung erzielt werden konnten. Auch bei den DPPC/PEG40S Formulierungen, die mit dem Ultraschallstab hergestellt wurden, stieg die Kontrastintensität nach dem Lyophilisieren nochmal deutlich an. Bei den DSPC/PEG40S Formulierung war nur ein leichter Anstieg der Kontrastintensität durch das Gefriertrocknen festzustellen. Jedoch war nach dem Gefriertrocknen nur noch wenig Unterschied zwischen den verschiedenen Einstellungen bei der Herstellung zu sehen und beide Formulierungen zeigten nach dem Gefriertrocknen eine Kontrastverstärkung zwischen 50 und 70 %. Bei der Herstellung von Ultraschallkontrastmitteln werden die Mischungen häufig gefriergetrocknet^{16, 102}. Zum Schutz der Formulierungen werden bestimmte Zucker als Cryo-Schutzmittel verwendet, bspw. Mannitol, Sucrose oder Trehalose¹⁰³. Mannitol bietet den geringsten Schutz, da es die Kristallisation von Wasser nicht ausreichend verhindert und dadurch die Lipidhülle der Formulierungen zerstört, wodurch Luft eindringen kann¹⁰⁴. Zucker, die die Bildung von Eis aus Wasser komplett verhindern, bspw. Sucrose und Trehalose, schützen die Lipidhülle

vor Rissen. Der Ultraschallkontrast wurde bei Verwendung dieser Cryo-Schutzmittel schlechter¹⁰³. Da sich die mittleren Grauwerte der DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S Mischungen nach dem Lyophilisieren verbessert hatten, kann davon ausgegangen werden, dass der Schutz durch die PEG-Ketten nicht komplett war, sondern, wie für Mannitol beschrieben, evtl. Risse in der Lipidhülle auftraten, in die Luft eindrang, welche beim Resuspendieren des Pulvers in der Hülle eingeschlossen wurde. Dies verstärkte den Kontrast sowohl bei den Formulierungen, die durch die Herstellung mit dem Ultraschallstab sowieso bereits Luft enthielten, als auch bei den mit dem Ultraschallbad hergestellten Formulierungen, die niedrige mittlere Grauwerte erzielten und durch das Gefriertrocknen eine starke Erhöhung der Kontrastintensität aufwiesen. Das gleiche gilt auch für die verschiedenen Lipidmischungen, die teilweise vor dem Gefriertrocknen keinerlei Kontrastverstärkung zeigten.

Die Untersuchung der verschiedenen Herstellungsmethoden zeigte, dass bei der Herstellung mit dem Ultraschallstab, bei beiden getesteten Lipidformulierungen immer hohe mittlere Grauwerte erzielt werden konnten. Diese Erhöhung der Kontrastintensität wird auf bei der Herstellung eingearbeitete Luft zurückgeführt. Die Mischung verschiedener Lipide zeigte, dass vor allem die Tetraetherlipide vielversprechende Zusätze, vor allem für die DPPC/PEG40S-Mischungen waren, und deren Ultraschallkontrastintensität vermutlich durch eine Stabilisierung der Hülle verbessern konnten. Die Gefriertrocknung konnte ebenfalls bei fast allen liposomalen Formulierungen die Kontraststärke erhöhen, was auch hier auf Lufteinschlüsse während des Lyophilisierens zurückgeführt wurde.

**KAPITEL 6: MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN
AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN**

6. MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER- NANOPARTIKELN

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zu den Kraftmessungen von Polymer-Nanopartikeln gezeigt, die als Testobjekt für ein Modellsystem zur Bestimmung elastischer Eigenschaften nanoskaliger Systeme dienen. Es sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Elastizitäten der liposomalen Formulierungen für unterschiedliche Ultraschallkontrastintensitäten verantwortlich sein können. Da die Ultraschallkontrastmittel sehr labil sind, wurde das Modellsystem zunächst mit PLGA-Nanopartikeln aufgebaut. Die viskoelastischen Eigenschaften von nanoskaligen Systemen können mit dem Rasterkraftmikroskop ermittelt werden, das nicht nur in der Lage ist, die Topografie von nanoskaligen Substanzen darzustellen, sondern ebenfalls die elastischen Eigenschaften solcher Substanzen zu messen. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden der Einfluss von verschiedenen Partikelgrößen und der Lagerungsdauer auf den Elastizitätsmodul untersucht. Unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten bei der Herstellung der Nanopartikel steuerten deren Radius. Anschließend wurden die verschiedenen Partikelgrößen (150, 200, 250 und 300 nm) über einen Zeitraum von sieben Tagen mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht und die Elastizitätsmodule (E-Modul oder Young Modul [MPa]) bestimmt.

6.1 ERGEBNISSE DER KRAFTMESSUNGEN

Zwei Minuten nach Aufbringen der Nanopartikelsuspensionen auf Glasobjektträger, deren Oberflächen zuvor mit Aminosilan positiv geladen wurden, um eine bessere Haftung der negativ geladenen Nanopartikel auf der Glasoberfläche zu gewährleisten, wurde der Überstand abgeklopft und der Objektträger mit Druckluft getrocknet. Zunächst erfolgte die Aufnahme eines Übersichtsbildes mit der Kraftspitze im „intermittent contact (air)“-Modus,

6. MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN

um die Partikel zu lokalisieren. Die Auswahl der gewünschten Partikelgröße geschah nach Bestimmung der Partikelhöhe. In Abbildung 34 ist ein Höhenbild von Nanopartikeln als Beispiel gegeben. Die schwarze Linie (s.a. blauen Pfeil) markiert den Querschnitt durch einen Partikel. Im unteren Teil des Bildes ist dieser Querschnitt dargestellt. Hier kann man erkennen, dass die Nanopartikel deutlich breiter als hoch erschienen (400 nm breit und 200 nm hoch). Um Verfälschungen der Messergebnisse, durch Einflüsse der Partikel selbst oder durch den Untergrund zu vermeiden, wurden die Partikel anhand ihrer Höhe ausgewählt und die maximale Eindringtiefe der AFM-Spitze auf 10 % dieser Partikelhöhe festgelegt^{70, 73}.

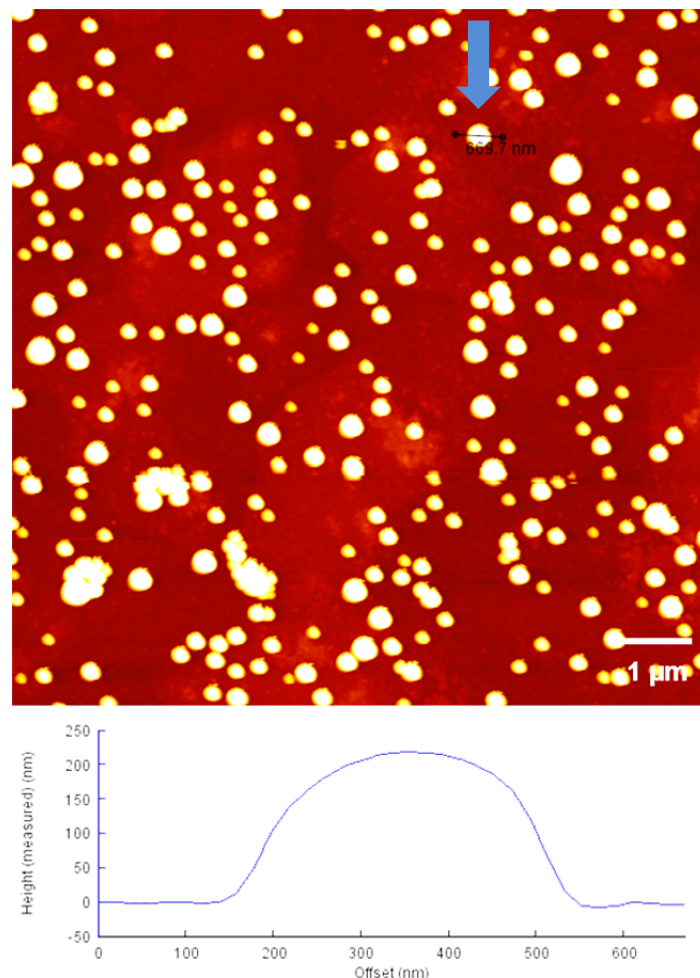


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung von Nanopartikeln. Die schwarze Linie (s.a. blauen Pfeil) im oberen Teil des Bildes zeigt den Partikel und die Stelle an welcher der Querschnitt gemacht wurde. Im unteren Teil des Bildes ist der Querschnitt durch den Nanopartikel zu sehen. Deutlich zu erkennen ist der größere Durchmesser im Vergleich zur Partikelhöhe.

6. MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON POLYMER-NANOPARTIKELN

Anschließend wurden fünf Partikel markiert und auf jedem Nanopartikel zehn Kraftmessungen ausgeführt. Daraufhin war es nötig, noch einmal ein Bild der Partikel zu machen, um sicher zu gehen, dass diese während der Messung nicht verrutscht sind. Die erhaltenen Kraftkurven (Weg-Zeit-Diagramme) wurden mit der geräteeigenen Software (JPK Image Processing) ausgewertet und dabei das Hertzmodell nach Sneddon für das Paraboloid zu Grunde gelegt und eine Poisson-Zahl von 0,5 für nicht komprimierbare Materialien gewählt⁷⁰.

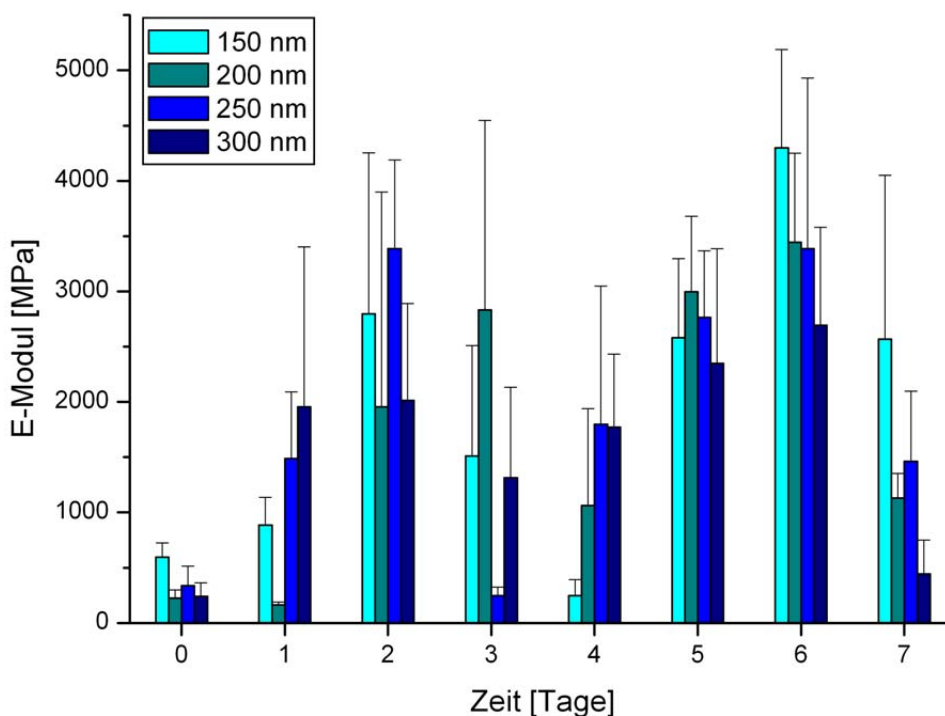


Abbildung 35: Elastizitätsmodule der vier verschiedenen Polymer-Nanopartikel-Größen gemessen über einen Zeitraum von sieben Tagen.

Am Tag der Herstellung variierte das Young Modul der vier verschiedenen Partikelgrößen zwischen $225,5 \pm 73,0$ MPa (200 nm), $240,7 \pm 122,8$ MPa (300 nm), $337,1 \pm 176,8$ MPa (250 nm) und $595,0 \pm 129,9$ MPa (150 nm). Es war kein Zusammenhang zwischen

Elastizitätsmodul und Partikelgröße zu sehen. Auch an den folgenden sieben Messtagen konnte kein Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Elastizitätsmodul gefunden werden.

Am Tag nach der Herstellung stieg der Wert für das Young Modul bei drei Partikeln auf ~ 890 MPa bis knapp 2000 MPa stark an. Nur der Elastizitätswert der 200 nm-Partikel fiel ab auf ~160 MPa. Am Tag zwei nach der Herstellung blieb der Wert für die 300 nm-Partikel konstant bei ~2000 MPa, während für die anderen Partikelgrößen die Young Module weiter anstiegen, auf ~2000, ~3000 und ~3400 MPa. Am Tag drei sanken die Werte wieder ab (mit Ausnahme der 200 nm-Partikel) und am darauffolgenden war wieder ein Anstieg der Werte zu erkennen. In Abbildung 35 ist diese wellenförmige Fluktuation zu erkennen.

Die Werte der Standardabweichung waren teilweise sehr groß, mit Ausnahme der Messungen, die gleich nach der Herstellung der Nanopartikel durchgeführt wurden. Der maximale Elastizitätsmodul wurde mit den 100 nm – Partikeln am Tag 6 mit ~ 4300 MPa erreicht. Der kleinste Wert wurde am Tag 2 bei den 200 nm – Partikeln gemessen mit 163,1 MPa. Siehe dazu auch Tabelle 6 und Abbildung 35.

6. MESSUNG ELASTISCHER EIGENSCHAFTEN AM BEISPIEL VON
POLYMER-NANOPARTIKELN

Tabelle 6: Young Module der verschiedenen Partikelgrößen im Laufe der Lagerung.

	150 nm	200 nm	250 nm	300 nm
Lagerung [Tage]	Young Modul [MPa]	Young Modul [MPa]	Young Modul [MPa]	Young Modul [MPa]
0	595,0 ± 129,9	225,5 ± 73,0	337,1 ± 176,8	240,7 ± 122,8
1	885,6 ± 250,4	163,1 ± 25,5	1488,9 ± 601,8	1956,2 ± 1445,8
2	2798,0 ± 1454,0	1955,5 ± 1943,33	3386,7 ± 800,8	2014,2 ± 876,7
3	1511,6 ± 997,9	2833,2 ± 1712,3	248,1 ± 76,4	1313,5 ± 819,4
4	246,1 ± 146,7	1063,2 ± 877,7	1797,2 ± 1251,3	1772,2 ± 660,7
5	2581,6 ± 715,5	2997,0 ± 681,5	2765,4 ± 602,8	2347,5 ± 1040,3
6	4299,2 ± 887,7	3443,9 ± 804,8	3388,0 ± 1540,8	2692,9 ± 887,7
7	2567,5 ± 1484,47	1129,5 ± 222,2	1463,4 ± 634,3	443,2 ± 306,7

6.2 DISKUSSION

Ultraschall bringt die in Ultraschallkontrastmitteln enthaltenen Gasbläschen zum Oszillieren. Die Kontrastmittel sind, aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften zwischen dem enthaltenen Gas und dem umgebenden Medium, starke Reflektoren der Ultraschallwellen. Neben dem Radius und der Ultraschallfrequenz ist die Reflexion der Ultraschallwelle von der Kompressibilität zwischen Gasbläschen und dem umgebenden Gewebe abhängig¹. Zur Messung der Kompressibilität von verschiedenen Materialien eignet sich das AFM, da damit mechanische Eigenschaften sowohl von Bulkmaterial als auch von individuellen Partikel oder auch Liposomen bei gleichzeitiger bildlicher Darstellung der untersuchten Region vor und nach den Eindrückexperimenten durchgeführt werden können. Mit Kraft-Weg-Kurven kann die Elastizität des Materials als das Elastizitätsmodul oder auch Young Modul, berechnet werden¹⁰⁵. Das Young modul ist eine Materialkonstante und bezeichnet den Materialwiderstand während Dehnung oder Komprimierung und ist unabhängig von der Art der Deformierung ist^{68, 69}.

Als Testobjekt zum Aufbau eines Modellsystems zur Messung elastischer Eigenschaften wurden PLGA-Nanopartikel hergestellt und vermessen. Das Polymer PLGA ist ein von der FDA zugelassenes, bioverträgliches und bioabbaubares Co-Polymer¹⁰⁶. Es wird eingesetzt in Wirkstofffreisetzungssystemen im Mikrometer¹⁰⁷- und Nanometerbereich¹⁰⁸ oder auch als Implantat-Material¹⁰⁹. Bei diesen Anwendungen sind die mechanischen Eigenschaften, wie Härte oder Elastizität, von großer Bedeutung. Im vorliegenden Experiment wurden dabei nicht nur die Elastizitätsmoduln der verschiedenen Partikelgrößen bestimmt, sondern auch die Veränderungen der Elastizitätsmoduln durch das Abbauverhalten von PLGA über den einwöchigen Messzeitraum beobachtet.

Vier verschiedene Partikelgrößen (150, 200, 250 und 300 nm) wurden hergestellt und die Young Module an sieben aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Am Tag der Herstellung schwankte das Young Modul zwischen $225,5 \pm 73,0$ MPa (200 nm), $240,7 \pm 122,8$ MPa (300 nm), $337,1 \pm 176,8$ MPa (250 nm) und $595,0 \pm 129,9$ MPa (100 nm). Es konnte keine Größenabhängigkeit des Elastizitätsmoduls gefunden werden, weder am Tag der Herstellung, noch an den sieben darauffolgenden Tagen. Debreuil *et al.* führten ein ähnliches Experiment, ebenfalls mit dem Rasterkraftmikroskop, auf Polyelektrolytkapseln durch, die aus Natrium-Polystyrolsulfonat und Polyallylaminhydrochlorid hergestellt wurden. Sie verglichen unter anderem, verschiedene Kapselgrößen und konnten einen Zusammenhang zwischen Größe und Young Modul finden. Das Elastizitätsmodul der $5\text{ }\mu\text{m}$ – Kapseln lag bei $1,3 \pm 0,15$ GPa und das der $10\text{ }\mu\text{m}$ – Kapseln bei $1,9 \pm 0,2$ GPa ¹¹⁰. Paik *et al.* untersuchten mit dem AFM das Young Modul von Polypropylen Nanopartikeln der Größen 200, 250, 370 und 500 nm. Es konnte keine Verbindung zwischen Partikelgröße und Elastizitätsmodul gefunden werden, was mit der komplizierten Anordnung der Polymerketten innerhalb der Partikel begründet wurde ¹⁰⁵. Im Hinblick auf die Ergebnisse von Debreuil *et al.* und Paik *et al.* wird angenommen, dass ein Zusammenhang zwischen Partikelgröße und Young Modul erst im Mikrometerbereich zum Tragen kommt und nicht im nanoskaligen Bereich. Für PLGA (50:50) Bulkmaterial fanden Middleton *et al.* ¹¹¹ und Van de Velde *et al.* ¹¹² Young Module bei 2,0 GPa bzw. 2,5 GPa. Die für dieses Experiment hergestellten Nanopartikel zeigten deutlich kleinere Elastizitätsmodule zwischen 225 MPa und 600 MPa. Dies kann zum einen am Unterschied zwischen Bulk-Material und Nanopartikeln, zum anderen aber auch an den unterschiedlichen Messmethoden liegen (Messmethoden wurden nicht angegeben).

Ein äußerst interessantes Ergebnis, im vorliegenden Experiment, war die wellenförmige Fluktuation der Elastizitätsmodule im Verlauf der sieben Tage der Untersuchung. Dies könnte mit dem Abbauverhalten von PLGA zusammenhängen. Eine wichtige Tatsache, zu Stabilität

und Abbauverhalten, wurde von Miller *et al.*¹¹³ entdeckt: die Halbwertszeit von 100 % PGA (Poly-Glykolid) sank von fünf Monaten auf eine Woche, bei Mischung im Verhältnis 50:50 mit PLA und stieg wieder auf sechs Monate an für reines PLA (Poly-Laktid). Das bedeutet, dass das PLGA 50:50 Co-Polymer, welches auch bei den vorliegenden Experimenten Verwendung fand, die kürzeste Halbwertszeit besitzt. Die Halbwertszeiten wurden für Implantat-Materialien bestimmt, die in Ratten eingepflanzt wurden. Variationen der Polymerzusammensetzung zwischen 75-100 % PLA und 25 - 0 % PGA führten zu verbesserten Halbwertszeiten von zwei Wochen bis sechs Monaten. Andere Arbeitsgruppen untersuchten das Abbauverhalten von implantiertem Material. Ge *et al.*¹¹⁴ untersuchten bspw. gestrickte Polymer-Materialien. Sie verglichen Fäden, bestehend aus PLLA (Poly-L-Laktid) und PLGA (10:9), miteinander, nachdem sie in einer Strickmaschine gestrickt wurden. Das Young Modul der gestrickten Polymer-Materialien wurde *in vitro* für 4, 8, 12, 16 und 20 Wochen getestet. Nach vier Wochen kam es zu einem Absinken des Young Moduls von ~300 MPa auf ~180 MPa, und anschließend wieder zu einer kontinuierlichen Zunahme, bis zu Woche 20, auf ~280 MPa. Das Young Modul von extrudierten Polymer/Salz-Röhren, die aus PLGA 75:25 und PLLA bestehen, wurde von Widmer *et al.*¹¹⁵ 42 Tage lang getestet. Dabei wurde festgestellt, dass das Young Modul beider Polymere zunächst ab-, dann zu- und anschließend wieder abnahm. Der Trend war jedoch nicht signifikant. Es wurde angenommen, dass dieses Phänomen durch Quellung des Polymers verursacht wurde.

PLGA und PLLA werden durch Hydrolyse abgebaut. Die Hydrolyse findet vor allem in der amorphen Phase dieser semi-kristallinen Materialien statt. Wasser dringt in den amorphen Bereich schneller ein, als in die kristallinen Bereiche und die Polymerketten beginnen sich abzubauen. Nachdem die amorphen Regionen durch Hydrolyse abgebaut wurden, beginnt der zweite Schritt des Polymerabbaus, der die kristallinen Bereiche mit einschließt. Der Kristallisationsgrad nimmt während der ersten Abbaustufe zu und nimmt in der zweiten Stufe

wieder ab ¹¹⁶. Langsamere Raten für die Hydrolyse wurden für andere aliphatische Polyester und Co-Polymere gefunden ¹⁰⁶. Der Polymerabbau folgt außerdem einem heterogenen Mechanismus, bei dem der Abbau im Inneren schneller abläuft, als an der Oberfläche. Dies wird von den beim Abbau entstehenden Säuren (Milchsäure, Glykolsäure) verursacht, die in der Lage sind, den pH-Wert der Umgebung abzusenken, was wiederum die Hydrolyse der Ester-Bindungen weiter vorantreibt. Dieses Phänomen wird als Autokatalyse bezeichnet ¹¹⁷,
¹¹⁸.

Es wird daher vermutet, dass diese wellenförmige Fluktuation der Young Module der PLGA Nanopartikel durch Quellung und Abbauvorgänge innerhalb der sieben Tage des Experiments verursacht wurde.

Die ersten Experimente zur Bestimmung elastischer Eigenschaften an Nanomaterialien waren für die PLGA-Nanopartikel erfolgreich und enthüllten gleichzeitig das Abbauverhalten des Co-Polymers während der einwöchigen Experimentalreihe. Der nächste Schritt sollte die Untersuchung der elastischen Eigenschaften der nanoskaligen Ultraschallkontrastmittel sein, um den Einfluss der Elastizität auf die Ultraschallkontrastverstärkung bestimmen zu können.

KAPITEL 7: *IN VITRO* PLAQUE-TARGETING

7. *IN VITRO* PLAQUE-TARGETING

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zum Plaque-Targeting gezeigt. Zunächst wurde mit dem Rasterkraftmikroskop mittels fibrinmodifizierter Objektträger getestet, ob die Kopplung von Antifibrin an die Liposomen erfolgreich war und die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung funktioniert. Die Entwicklung eines ersten, einfachen *in vitro*-Plaque Modells ermöglichte das Untersuchen der Targeting-Fähigkeit der mit Antikörpern gekoppelten liposomalen Formulierungen im Ultraschall. Dieses *in vitro*-Modell wurde anschließend mit, in kleine Stücke geschnitten, Plaques (entnommen aus menschlichen Halsschlagadern) weiter modifiziert.

7.1 ERGEBNISSE

In Abbildung 36 ist der Unterschied zwischen unmodifizierten Glasobjektträgern und mit Fibrin modifizierten Glasobjektträgern dargestellt. In Abbildung 36A sieht man die glaseigene Struktur, die in 36B, nach der Modifizierung mit Fibrin, nicht mehr sichtbar war. In Abbildung 36C befinden sich DSPC/PEG40S/DPPE-CC-AK Liposomen auf den modifizierten Objektträgern. Die Liposomen sind gut zu erkennen. Der Hintergrund wirkt etwas anders als in 36B, was von gespreitetem Lipid kommen könnte. In Kapitel 3 wurden die Partikelgrößen der Ultraschallkontrastmittel bestimmt und dabei festgestellt, dass diese aus zwei Fraktionen bestehen. In Abbildung 36C sind die in der Überzahl vorkommenden, sehr kleinen Partikel zu sehen. Die mit Antikörpern gekoppelten liposomalen Formulierungen banden erfolgreich an einer fibrinreichen Oberfläche.

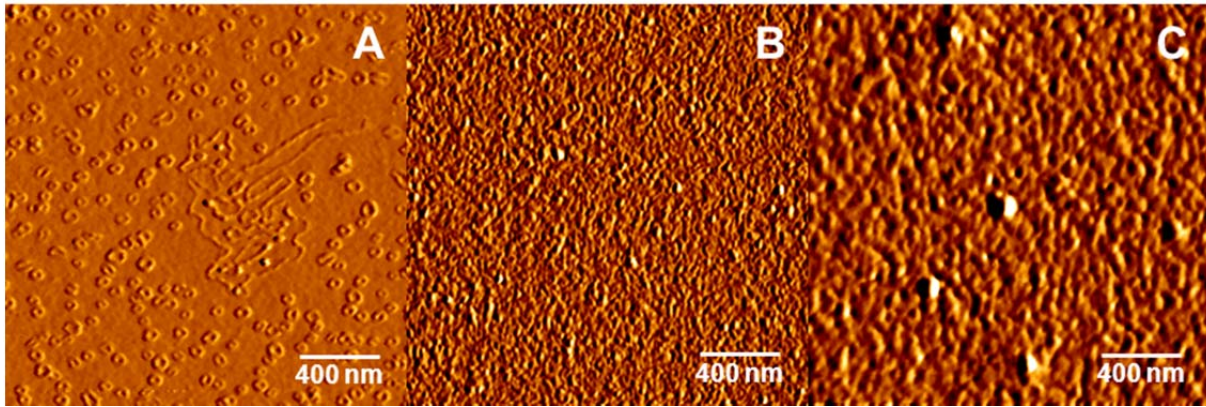


Abbildung 36: A) unmodifizierter Glasobjektträger, B) mit Fibrin modifizierter Glasobjektträger, C) Antifibrin-gekooppelte Liposomen auf dem modifizierten Glasobjektträger.

Im darauffolgenden *in vitro* Experiment, mit künstlichen und später auch menschlichen Plaques, wurden schließlich das Targeting und die Bindungsstabilität unter Strömung genauer untersucht.

In Abbildung 37A ist im markierten Bereich (weißes Oval) der Schlauchstreifen ganz leicht zu erkennen. Dies wurde durch, am Schlauchstreifen anhaftende, Luftblasen (durch das Installieren in das Flussmodell) hervorgerufen. Aber es sind keine hellen Plaques zu erkennen, was bedeutete, dass die künstlichen Plaques keine Eigenreflexion im Ultraschallbild verursachten. Anschließend wurden Liposomen, die nicht mit Antikörpern modifiziert waren, auf die künstlichen Plaques gegeben und der Schlauchstreifen nach kurzer Inkubationszeit in das Flussmodell eingesetzt. Es konnte, wie zu erwarten war, keine hellen Stellen im Ultraschallbild gesehen werden. Das bedeutete, dass die liposomalen Formulierungen auch nicht unspezifisch am Fibrin hafteten.

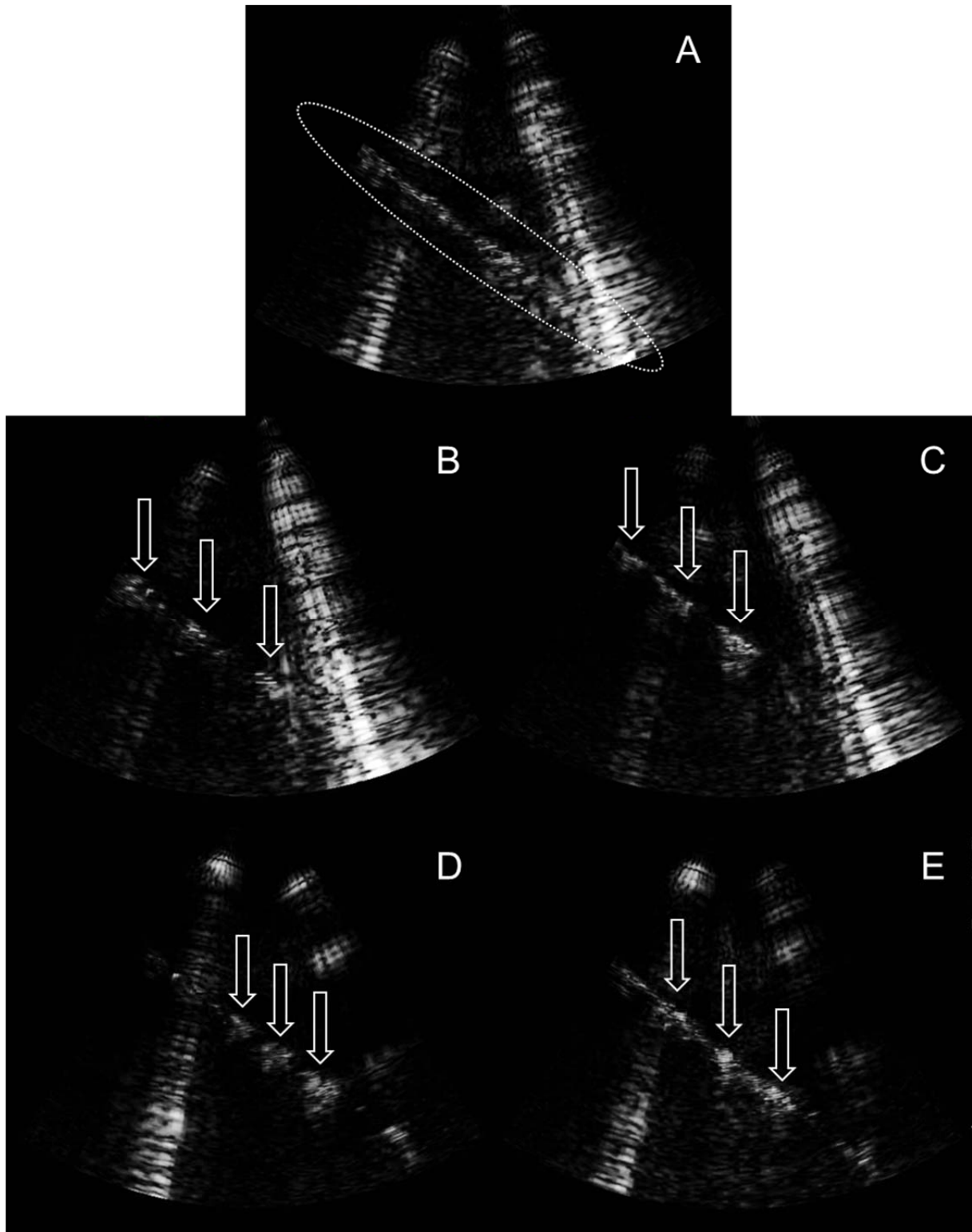


Abbildung 37: Schlauchstreifen im Flussmodell mit den künstlichen, fibrinreichen Plaques nach Zugabe von: (A) unmodifizierten Liposomen, (B) DPPE-CC-AK, (C) DSPE-PEG2000-CC-AK, (D) DPPE-CC-AK lyophilisiert, (E) DSPE-PEG2000-CC-AK lyophilisiert.

In Abbildung 37B und 37C sind helle Stellen zu erkennen (weiße Pfeile). Hier wurden die liposomalen Formulierungen mit dem kurzen (DPPE-CC) und dem langen Ankerlipid (DSPE-PEG2000-CC) und anhängenden Antikörpern auf die Plaques gegeben. Wo sie haften blieben, waren sie als hell leuchtende Stellen zu erkennen und damit konnte die Plaque lokalisiert werden. In Abbildung 37D und 37E wurden die gleichen Formulierungen verwendet, wie bei 37B und 37C, jedoch zuvor gefriergetrocknet. Auch hier sind die hellen Plaques zu erkennen (weiße Pfeile).

In einem weiteren Experiment wurden zusätzlich zu den künstlichen, fibrinreichen Plaques, noch in kleinere Stücke geschnittene menschliche Plaques aufgeklebt, damit sie in das Flussmodell eingebracht werden konnten. In Abbildung 38 ist der Schlauchstreifen, mit rechts zweimal Fibrinpulver und links zwei Stücke der menschlichen Plaque, vor und während des *in vitro*-Experiments zu sehen (grün: inerter Kleber). Die Lücke zwischen den beiden „Plaque-Typen“ wurde bewusst gewählt, und ist auch im Ultraschallbild zu erkennen. Die liposomalen Formulierungen hafteten somit auch an den menschlichen Plaques und blieben auch während dem Fluss (50 ml/min) daran haften.

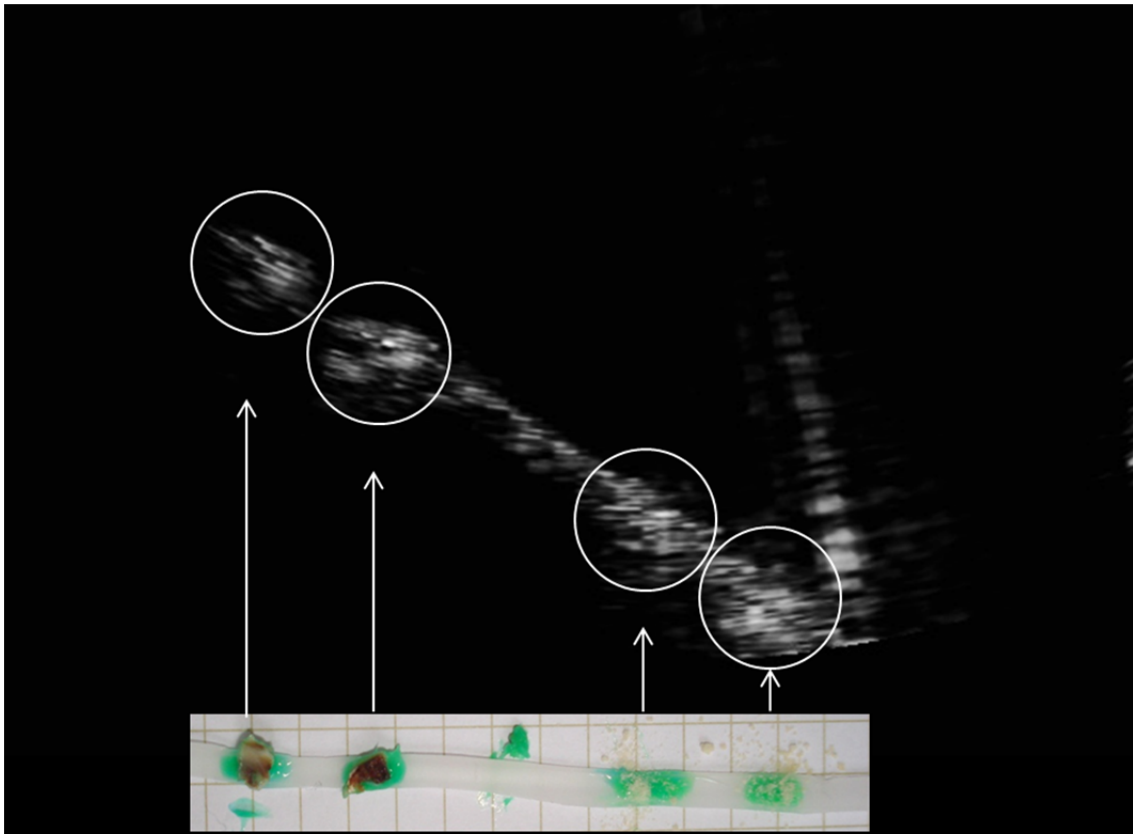


Abbildung 38: Künstliche und menschliche Plaques sind zusammen auf einem Schlauchstreifen aufgebracht, mit einer bewusst gewählten Lücke zwischen den beiden „Plaque-Typen“, die auch im Ultraschallbild zu erkennen ist. Im unteren Bild ist der Schlauchstreifen nach der Präparation zu sehen. Links befinden sich die Stücke der menschlichen Plaque und rechts die Fibrinpulver-Plaques.

7.2 DISKUSSION

Im Bestreben, gefährliche Plaques im menschlichen Körper aufzuspüren, wurden viele verschiedene Ansätze entwickelt. Mit Hilfe der Computertomografie (CT) können bspw. verkalkte (calcifizierte) Plaques ohne die Verwendung von Kontrastmitteln dargestellt werden. Unter Zuhilfenahme von entsprechenden Kontrastmitteln, können sogar nicht-verkalkte Plaques und Stenosen dargestellt werden ⁴³. Auch die Magnetresonanztomografie (MRT) wird eingesetzt, um Plaques zu charakterisieren. Hierbei konzentriert man sich vor allem auf den großen, nekrotischen und lipidreichen Kern der Plaque, welcher auch ohne Kontrastmittel dargestellt werden kann ⁴¹. Die Verwendung von verschiedenen paramagnetischen Kontrastmitteln erleichtert die Darstellung der Plaques, da sie das starke Signal-zu-Rausch-Verhältnis reduzieren helfen und durch passives Targeting innerhalb der Plaques akkumulieren ¹¹⁹ oder durch aktives Targeting mit Antikörpern, wie bspw. Antifibrin, an den Plaques haften bleiben ¹²⁰ und diese somit besser darstellen. CT und MRT haben den Vorteil, dass sie einfach in der Anwendung sind, jedoch können sie klassisch nicht zwischen den gefährlichen und den stillen Plaques unterscheiden und sind zudem extrem teure Untersuchungsverfahren.

Daher gibt es auch viele Versuche, durch Doppler-Ultraschall eine Darstellung und eine Charakterisierung von arteriosklerotischen Plaques zu erreichen. Hierbei wird oft der IVUS (intravaskulärer Ultraschall) benutzt, entweder ohne Kontrastmittel ¹²¹ oder mit Ultraschallkontrastmitteln (auch mit Antikörpern für aktives Targeting) ¹²². IVUS ist allerdings ein invasives Verfahren. Einfacher anzuwenden ist das nichtinvasive, diagnostisch und therapeutisch nutzbare Ultraschallgerät, das in jeder guten Arztpraxis zu finden ist. Auch hier gibt es viele Ansätze, arteriosklerotische Plaques, sowohl ohne ¹²³ als auch mit ¹²⁴ Ultraschallkontrastmitteln, darzustellen und zu charakterisieren.

Bei der Untersuchung von arteriosklerotischen Plaques mit Ultraschall, ohne kontrastverstärkende Mittel, wird hochfrequenter Ultraschall angewendet, womit die Dicke der Intima-Media gemessen werden kann. Außerdem können, durch die Bestimmung des Grauwertes des Ultraschallbildes, die verschiedenen Plaque-Bestandteile (Calcium, Einblutungen, Nekrose, Lipide und fibröses Gewebe) unterschieden werden ¹²³. Allerdings lässt sich mit Ultraschalluntersuchungen alleine noch keine erfolgreiche Bestimmung der wirklich gefährlichen Plaques, also der Plaques, die kurz davor stehen, zu platzen, durchführen. Denn nicht die Größe der Plaque, und damit der Grad der Gefäßverengung, sind relevant, sondern die Zusammensetzung der Plaque ¹²⁵. Die arteriosklerotische Plaque entwickelt sich über Jahre hinweg. Die ersten Stadien (Typ I-IV) bleiben unbemerkt und verursachen keine Probleme. Sie wachsen langsam, durch Bildung von Schaumzellen und Einlagerung von Lipiden, wobei ein oder mehrere Lipidkerne innerhalb der Plaque entstehen können. Die fortgeschrittenen Stadien der Plaque, und damit auch die vulnerable Plaque, sind durch eine immer dünner werdende fibröse Kappe und einen immer größer werdenden nekrotischen Kern gekennzeichnet. Entzündungen und Einblutungen können auftreten und zeigen den Entwicklungsgrad der Plaque. Wenn die Kappe reißt, bilden sich Blutgerinnsel mit einem Fibrinnetz am Riss ³⁶. Die beliebteste Targeting-Struktur ist daher die Entzündung via Selektine (E- und P-Selektin) ¹⁷ oder ICAM (intercellular adhesion molecule) ⁵¹ und VCAM (vascular cell adhesion molecule) ⁵⁰. Fibrin ist ebenfalls ein sehr guter Marker für eine vulnerable Plaque, da Fibrinnetzwerke in Form von Thromben in kleinen Rissen der fibrösen Kappe vorhanden sind ^{35, 126}.

Ziel dieses Experiments war es daher, die nanoskaligen Ultraschallkontrastmittel mit Antifibrin-Antikörpern zu modifizieren und deren Targeting-Fähigkeit *in vitro* zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurde dazu die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung zwischen Fibrin und Antifibrin auf Glasobjektträgern mit dem AFM untersucht. Dies ist eine schnelle und einfache Methode, nicht nur um die Morphologie einer Probe, sondern auch Wechselwirkungen zu untersuchen⁶¹. Glas zeigte unter dem AFM eine eigentümliche Struktur (Abbildung 36A). Nach dem Modifizieren der Oberfläche mit Fibrin, mittels Cyanurchlorid, war diese Struktur nicht mehr sichtbar. Dennoch war die Oberfläche durch die Modifizierung nicht glatt sondern leicht rau (Abbildung 36B). Nachdem Formulierungen mit und ohne Antikörper auf die Objektträger gegeben und nach kurzer Zeit abgespült wurden, waren im AFM-Bild nur die Antikörper-gekoppelten Formulierungen zu sehen. Die Formulierungen ohne Antikörper wurden abgespült und hafteten nicht auf dem Glas. In Abbildung 36C sind die liposomalen Formulierungen zu erkennen. In Kapitel 3 wurde bereits erwähnt, dass die Ultraschallkontrastmittel überwiegend zwei Größenfraktionen aufwiesen. In Abbildung 36C ist nur die kleinere Größenfraktion zu sehen, da diese kleineren Partikel auch in Überzahl vorhanden sind.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem AFM war der nächste Schritt die Entwicklung eines ersten, einfachen *in vitro* Plaque-Modells. Der im Flussmodell enthaltene C-Flex®-Schlauch bestand aus einem Styrol-Ethylen-Butylen modifizierten Block-Co-Polymer und war mit einem Silikonöl überzogen. Dies machte es schwierig die Schlauchoberfläche auf dieselbe Art, wie die Glasobjektträger zu modifizieren, denn die Verwendung von Caro'scher Säure und des organischen Lösungsmittels Chloroform zerstörte den Schlauch völlig. Daher musste eine andere Methode gefunden werden, um Fibrin auf der Oberfläche zu fixieren. Der inerte blau-gelb-Kleber, der bei bestimmten rasterkraftmikroskopischen Messungen Anwendung findet, schien geeignet. Auf den noch feuchten Zweikomponenten-Kleber wurde das Fibrin-Pulver gestreut und nach dem Trocknen ungebundenes Pulver entfernt. Weder der Kleber noch das Pulver zeigten eine Reflexion im

Ultraschall (s.a. Abbildung 37A). Die statisch auf die künstlichen Plaques aufgetragenen Formulierungen ohne Antikörper hafteten nicht auf den künstlich hergestellten Plaques und wurden, nachdem der Schlauchstreifen in das Flussmodell eingesetzt worden war, einfach weggespült. Dagegen hafteten die Formulierungen, die mit Antifibrin gekoppelt waren, sehr gut an den Plaques und wurden auch durch den Fluss (50 ml/min) nicht fortgerissen. Dieses erfolgreiche *in vitro* Targeting ist in Abbildung 37B und 37C zu sehen. Nach dem Gefriertrocknen der liposomalen Formulierungen ging die Eigenschaft zum Fibrin-Targeting nicht verloren, wie die Abbildungen 37D und 37E zeigen.

In einem weiteren Experiment, einer Art *ex vivo* Experiment, wurde die Bindungsfähigkeit an kleinen Stücken von menschlicher Plaque getestet. Damit ein direkter Vergleich möglich war, wurde ein Schlauchstreifen sowohl mit Stücken einer menschlichen Plaque, als auch mit den künstlichen Fibrinpulver-Plaques vorbereitet, und bewusst eine Lücke zwischen den beiden Plaque-Typen belassen, damit im Ultraschallbild die beiden Plaque-Typen eindeutig zugeordnet werden konnten. In Abbildung 38 sind sowohl alle vier vorbereiteten Plaques, als auch die Lücke zwischen ihnen deutlich zu erkennen.

In den meisten Veröffentlichungen zum Plaque-Targeting wurde der invasive IVUS eingesetzt und dabei sowohl *in vitro* Experimente, bspw. mit einem PVA Cryogel Arterien-Phantom¹²⁷, als auch *ex vivo* Experimente mit menschlichen Koronararterien^{121, 128}, allerdings immer ohne Ultraschallkontrastmittel, durchgeführt. Beim IVUS wertete man die Kontrastunterschiede durch unterschiedliche Zusammensetzung der Plaques aus¹²⁸.

Bei Studien mit nichtinvasivem, diagnostischem Ultraschall, suchte man überwiegend nach Entzündungsmarkern und entwickelte dazu viele *in vitro* Modelle. In der Regel wird P-Selectin auf eine Petrischale fixiert und eine Flusskammer eingebracht^{17, 50, 129}. Auch ICAM-1 und VCAM-1 konnten mittels kultivierter Endothelzellen in eine Flusskammer eingebracht und als Zielstruktur für Ultraschallkontrastmittel genutzt werden⁵¹. In *ex vivo* Modellen

wurden Aorten von Knockout-Mäusen (ApoE-negativ) in eine Flusskammer eingebracht und mit Nanobläschen, die mit anti-ICAM-1 gekoppelt waren, zum Targeting von Gefäßendothel verwendet¹²⁴ oder Aorten von Yucatan Minischweinen untersucht, bei denen Arteriosklerose induziert und anschließend mit Antifibrinogen gekoppelte, ultraschallaktive Liposomen zum Fibrin-Targeting eingesetzt wurden¹³⁰. Bei *in vivo*-Experimenten mit Mäusen führte man erfolgreiches Targeting von entzündetem Gewebe mittels mit Antikörpern gekoppelte Microbläschen durch¹³¹.

Das Experiment mit den Aorten von Minischweinen¹³⁰ ist bisher das einzig bekannte, das Ultraschallkontrastmittel mit Fibrinogen-Antikörpern zum Fibrin-Targeting einsetzte. Es konnte keine Literatur gefunden werden, in denen Arbeitsgruppen ein Flussmodell nicht nur dazu verwendeten, den Ultraschallkontrast von Kontrastmitteln festzustellen, sondern auch gleichzeitig *in vitro*-Targeting durchführten. Das hier vorgestellte *in vitro* Plaque-Modell für nichtinvasives, ultraschallgestütztes Plaque-Targeting von fibrinreichen, arteriosklerotischen Plaques ist somit neu. Dieses Modell kann beliebig erweitert werden, um auch andere Strukturen, wie z.B. Entzündungsprozesse, Gefäßneubildung oder Thrombusanhaftung, gezielt zu finden und damit eine Differenzierung der arteriosklerotischen Plaque, verschiedenen Stadien, zu erreichen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass erfolgreich ein *in vitro* Plaque-Modell, sowohl mit künstlichen Fibrinpulver-Plaques, als auch mit klein geschnittenen menschlichen Plaques, aufgebaut werden konnte. Außerdem konnten erfolgreich, mit Antifibrin gekoppelte, Ultraschallkontrastmittel entwickelt werden, die selbst bei einer Flussrate von 50 ml/min an der künstlichen bzw. menschlichen Plaque haften blieben und diese als hell leuchtende Stellen im Ultraschallbild sichtbar machten.

KAPITEL 8: ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

8.1 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden neue, lipidbasierte, nanoskalige Formulierungen zur Anwendung als Ultraschallkontrastmittel und zum Targeting von arteriosklerotischen Plaques entwickelt und charakterisiert. Ziel war eine sehr gute Kontrastverstärkung bei Verwendung von diagnostischem, nicht-invasivem Ultraschall bei Frequenzen zwischen 1 und 3 MHz. Es konnte eine Methode zur Bestimmung elastischer Eigenschaften nanoskaliger Systeme mittels AFM entwickelt und am Beispiel von PLGA-Nanopartikeln getestet werden. Und schließlich wurde ein *in vitro* Plaque-Modell aufgebaut und das erfolgreiche Plaque-Targeting gezeigt.

Die Grundlagen zu Ultraschall und die Anwendung von Ultraschall in Diagnose und Therapie sowie besonders die Anwendung von ultraschallkontrastverstärkenden Mitteln wurden in der Einleitung (**Kapitel 1**) dargestellt. Ein kurzer Überblick zur Gefäßkrankheit Arteriosklerose, die Visualisierung dieser Erkrankung und *in vivo* Charakterisierungsmöglichkeiten wurde gegeben.

Die verwendeten Methoden, zur Herstellung der Ultraschallkontrastmittel bzw. PLGA-Nanopartikel (Filmmethode, Salting-out), deren physiko-chemische und morphologische Charakterisierung (PCS, LDA, Cryo-TEM, ^{31}P -NMR, AFM), die Messung der ultraschallkontrastverstärkenden Eigenschaften (Flussmodell) und der Nachweis des Fibrin-Targetings (*in vitro*-Plaque-Modell) wurden in **Kapitel 2** erläutert.

Kapitel 3 befasste sich mit den Ergebnissen der physiko-chemischen und morphologischen Charakterisierung der hergestellten liposomalen Formulierungen sowie von Polymer-Nanopartikeln. Es konnte sowohl mit PCS-Messungen, also auch mit AFM und Cryo-TEM

gezeigt werden, dass bei der Herstellung der liposomalen Ultraschallkontrastmittel zwei Größenfraktionen auftraten und mithilfe des ^{31}P -NMR wurde deutlich, dass Mizellen und Liposomen nebeneinander vorlagen. Die Herstellung von anderen Lipidmischungen führte zu ähnlichen Ergebnissen, was anhand von PCS-Messungen gezeigt wurde. Die erfolgreiche Kopplung von Antikörpern an die liposomalen Formulierungen und die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, konnten mit dem AFM nachgewiesen werden. Ebenfalls mittels PCS, wurde die erfolgreiche Steuerung der Größen der PLGA-Nanopartikel durch unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten, des bei der Herstellung verwendeten Ultra-Turrax®, gezeigt.

Kapitel 4 stellte die Ergebnisse der Ultraschallkontrastmessungen und der Untersuchungen zur Lagerungsstabilität der Formulierungen, im Hinblick auf den Ultraschallkontrast, dar. Durch die Verwendung eines Flussmodells konnten die Kontraststärken und auch die Lagerungsstabilität der Ultraschallkontrastmittel schnell und effektiv gemessen und mittels der ImageJ-Software als mittlere Grauwerte ausgewertet werden. Dabei wurden alle Kontrastmittel mit SonoVue®, einem käuflichen Ultraschallkontrastmittel mit Bläschengrößen zwischen 2 und 8 μm , verglichen.

Kapitel 5 befasste sich mit den Ergebnissen der Verbesserung der Kontrastintensität durch Variation der Herstellungsmethode, der Lipidzusammensetzung, sowie dem Gefriertrocknen. Die verschiedenen Mischungen wurden wieder im Flussmodell untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Herstellungsmethode teilweise starken Einfluss auf die Kontraststärke hatte. Durch die Verwendung des Ultraschallstabes, statt des Ultraschallbades, bei der Herstellung, konnten deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Auch die Zusammensetzung der liposomalen Formulierungen war entscheidend für die Kontrastintensität. Das Gefriertrocknen hatte ebenfalls einen großen Einfluss auf die Kontraststärke und führte beinahe immer zu einer Kontrastverbesserung. Selbst wenn die Herstellung der liposomalen Formulierungen mit dem Ultraschallbad geschah und diese dadurch einen schwächeren Ultraschallkontrast

aufwiesen, wurde dieser nach dem Gefriertrocknen enorm verbessert bei gleichzeitiger Reduzierung der Standardabweichung.

In **Kapitel 6** wurden, mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops, elastische Eigenschaften am Beispiel von Polymer-Nanopartikeln bestimmt. Da die elastischen Eigenschaften der liposomalen Ultraschallkontrastmittel einen Einfluss auf die Ultraschallkontrastintensität hätten haben können, wurde zunächst ein Modellsystem zur Messung von Elastizitäten entwickelt. Hierzu wurden Polymer-Nanopartikel unterschiedlicher Größen hergestellt und vermessen. Dabei zeigten sich auch die an der Partikeloberfläche stattfindenden Abbauphänomene der PLGA-Nanopartikel.

Kapitel 7 stellte ein selbst entwickeltes *in vitro* Plaque-Modell zur Untersuchung der spezifischen Targeting-Eigenschaften vor. Es konnte das erfolgreiche Fibrin-Targeting an künstlichen Plaques, bestehend aus Fibrin-Pulver, und an menschlichen, in kleine Stücke geschnittenen Plaques, gezeigt werden. Die mit Antikörpern gekoppelten liposomalen Formulierungen blieben auch unter Strömung an den künstlichen und menschlichen Plaques haften und die Plaques waren als helle Flecken im Ultraschallbild sehr gut zu erkennen.

8.2 AUSBLICK

In weiteren *in vitro*-Studien könnten weitere Lipidmischungen als Ultraschallkontrastmittel getestet werden. Die Auswahl an Lipiden und die Möglichkeiten der Kombination sind beinahe unbegrenzt. Ebenfalls denkbar wäre der Einsatz verschiedener lipophiler Gase, z.B. Schefelhexafluorid, welches u.a. auch im käuflich erhältlichen SonoVue® enthalten ist, um den Ultraschallkontrast nochmals zu verbessern. Die stark lipophilen Gase entweichen langsamer aus den Bläschen als Luft und können dadurch zu einem noch stabileren Ultraschallkontrast führen.

Nach dem erfolgreichen Fibrin-Targeting sind auch andere Zielstrukturen für das aktive Targeting denkbar. Beispielsweise Entzündung, Angiogenese oder Thrombenbildung via ICAM-1, VCAM-1, Selectinen oder auch Fibrin. Durch die Cyanurchlorid-Verknüpfung können sehr schnell verschiedenste Antikörper an die Oberfläche der liposomalen Formulierungen gekoppelt werden, daher ist auch gezielte Wirkstofffreisetzung denkbar. Nachdem die Formulierungen mit Hilfe von Antikörpern an den gewünschten Zielstrukturen gebunden haben, könnte durch Zerstörung der Bläschen ein im Bläschen eingeschlossener Wirkstoff explosionsartig freigesetzt werden. Ein guter Anwendungsbereich hierfür wäre die Thrombolyse, bei der mittels Fibrin-Antikörper die Ultraschallkontrastmittel am Thrombus haften bleiben und durch Zerstörung der Bläschen eine thrombolytisch wirksame Substanz freigesetzt wird, die durch die Kraft der Explosion sogar noch etwas tiefer in den Thrombus hineingepresst werden könnte, was die Auflösung des Blutgerinnsels nochmals verbessern würde.

Auch der Beginn von tierexperimentellen Studien wäre bereits mit den antifibrin-gekoppelten Ultraschallkontrastmitteln denkbar. Bisher existieren nur Tiermodelle zum Targeting von Entzündungen, welche kurz vor dem Experiment im Tier meist mechanisch verursacht

werden. ApoE-negative Mäuse können auch Plaques entwickeln, jedoch wurde bisher kein Fibrin-Targeting *in vivo* versucht, sodass dies ebenfalls ein neues Forschungsgebiet wäre.

KAPITEL 9:LITERATURVERZEICHNIS

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Schäberle, W., *Ultraschall in der Gefäßdiagnostik*. Springer: Berlin, 2009; Vol. 3., überarb. u. aktualis. Aufl.
2. Postema, M.; Gilja, O. H., Contrast-enhanced and targeted ultrasound. *World J Gastroenterol* 2011, 17, 28-41.
3. Kennedy, J. E., High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2005, 5, 321-7.
4. Lavon, I.; Kost, J., Ultrasound and transdermal drug delivery. *Drug Discov Today* 2004, 9, 670-6.
5. Tezel, A.; Mitragotri, S., Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. *Biophys J* 2003, 85, 3502-12.
6. Mitragotri, S., Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2005, 4, 255-60.
7. Anna, Y.; Matthieu, L. C.; Mariska, d. S.; Sander, L.; Holger, G.; Chrit, M., In vivo temperature controlled ultrasound-mediated intracellular delivery of cell-impermeable compounds. *J Control Release* 2012, 161, 90-7.
8. Alonso, A.; Dempfle, C. E.; Della Martina, A.; Stroick, M.; Fatar, M.; Zohsel, K.; Allémann, E.; Hennerici, M. G.; Meairs, S., In vivo clot lysis of human thrombus with intravenous abciximab immunobubbles and ultrasound. *Thromb Res* 2009, 124, 70-4.
9. Tiukinhoy-Laing, S. D.; Huang, S.; Klegerman, M.; Holland, C. K.; McPherson, D. D., Ultrasound-facilitated thrombolysis using tissue-plasminogen activator-loaded echogenic liposomes. *Thromb Res* 2007, 119, 777-84.
10. Lai, C. H.; Chuang, C. C.; Li, J. K.; Chen, S. C.; Chang, W. H., Effects of ultrasound on osteotomy healing in a rabbit fracture model. *Ultrasound Med Biol* 2011, 37, 1635-43.
11. Gramiak, R.; Shah, P. M., Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol* 1968, 3, 356-66.
12. Ziskin, M. C.; Bonakdarpour, A.; Weinstein, D. P.; Lynch, P. R., Contrast agents for diagnostic ultrasound. *Invest Radiol* 1972, 7, 500-5.
13. Feinstein, S. B.; Ten Cate, F. J.; Zwehl, W.; Ong, K.; Maurer, G.; Tei, C.; Shah, P. M.; Meerbaum, S.; Corday, E., Two-dimensional contrast echocardiography. I. In vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents. *J Am Coll Cardiol* 1984, 3, 14-20.
14. Hernot, S.; Klibanov, A. L., Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60, 1153-66.
15. Partovi, S.; Loebe, M.; Aschwanden, M.; Baldi, T.; Jäger, K. A.; Feinstein, S. B.; Staub, D., Contrast-enhanced ultrasound for assessing carotid atherosclerotic plaque lesions. *AJR Am J Roentgenol* 2012, 198, W13-9.
16. Alkan-Onyuksel, H.; Demos, S. M.; Lanza, G. M.; Vonesh, M. J.; Klegerman, M. E.; Kane, B. J.; Kuszak, J.; McPherson, D. D., Development of inherently echogenic liposomes as an ultrasonic contrast agent. *J Pharm Sci* 1996, 85, 486-90.
17. Takalkar, A. M.; Klibanov, A. L.; Rychak, J. J.; Lindner, J. R.; Ley, K., Binding and detachment dynamics of microbubbles targeted to P-selectin under controlled shear flow. *J Control Release* 2004, 96, 473-82.
18. Tiukinhoy, S. D.; Khan, A. A.; Huang, S.; Klegerman, M. E.; MacDonald, R. C.; McPherson, D. D., Novel echogenic drug-immunoliposomes for drug delivery. *Invest Radiol* 2004, 39, 104-10.
19. Negishi, Y.; Endo, Y.; Fukuyama, T.; Suzuki, R.; Takizawa, T.; Omata, D.; Maruyama, K.; Aramaki, Y., Delivery of siRNA into the cytoplasm by liposomal bubbles and ultrasound. *J Control Release* 2008, 132, 124-30.

20. Wink, M. H.; Wijkstra, H.; De La Rosette, J. J.; Grimbergen, C. A., Ultrasound imaging and contrast agents: a safe alternative to MRI? *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2006, 15, 93-100.
21. Deckers, R.; Rome, C.; Moonen, C. T., The role of ultrasound and magnetic resonance in local drug delivery. *J Magn Reson Imaging* 2008, 27, 400-9.
22. Apfel, R. E., Acoustic cavitation: a possible consequence of biomedical uses of ultrasound. *Br J Cancer Suppl* 1982, 5, 140-6.
23. http://optisonimaging.com/files/optison_pi.pdf.
24. <http://www.definityimaging.com/main.html#indication>.
25. http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000303/WC500055380.pdf.
26. Lasic, D., *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier: University of Michigan, 1993.
27. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 1989, 55.
28. Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E., Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res* 2004, 21, 1428-39.
29. Ibrahim, H.; Bindschaedler, E.; Doelker, E.; Buri, P.; Gurny, R., Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process. *International Journal of Pharmaceutics* 1992, 87, 239-246.
30. Athanasiou, K. A.; Niederauer, G. G.; Agrawal, C. M., Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996, 17, 93-102.
31. Gunatillake, P. A.; Adhikari, R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003, 5, 1-16; discussion 16.
32. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursache/n/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html?nn=50808>.
33. Schuijf, J. D.; Achenbach, S.; Zoghbi, W. A.; Boersma, E.; Raggi, P.; Weber, M.; Nagel, E.; Narula, J.; Wackers, F. J.; Poldermans, D.; Bax, J. J., How to identify the asymptomatic high-risk patient? *Curr Probl Cardiol* 2009, 34, 539-77.
34. Watkins, H.; Farrall, M., Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress. *Nat Rev Genet* 2006, 7, 163-73.
35. Choudhury, R. P.; Fuster, V.; Fayad, Z. A., Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3, 913-25.
36. Sary, H. C.; Chandler, A. B.; Dinsmore, R. E.; Fuster, V.; Glagov, S.; Insull, W.; Rosenfeld, M. E.; Schwartz, C. J.; Wagner, W. D.; Wissler, R. W., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15, 1512-31.
37. Sary, H. C., Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992, 421, 277-90.
38. Sary, H. C., Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol* 1994, 89 Suppl 1, 17-32.
39. Sary, H. C., *The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries*. In: Fuster V, Ross R, Topol E, et al., *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1996; Vol. 1, p 463-474.

40. Watanabe, Y.; Nagayama, M., MR plaque imaging of the carotid artery. *Neuroradiology* 2010, 52, 253-74.
41. Yuan, C.; Mitsumori, L. M.; Beach, K. W.; Maravilla, K. R., Carotid atherosclerotic plaque: noninvasive MR characterization and identification of vulnerable lesions. *Radiology* 2001, 221, 285-99.
42. Kooi, M. E.; Cappendijk, V. C.; Cleutjens, K. B.; Kessels, A. G.; Kitslaar, P. J.; Borgers, M.; Frederik, P. M.; Daemen, M. J.; van Engelshoven, J. M., Accumulation of ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in human atherosclerotic plaques can be detected by in vivo magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003, 107, 2453-8.
43. Achenbach, S.; Raggi, P., Imaging of coronary atherosclerosis by computed tomography. *Eur Heart J* 2010, 31, 1442-8.
44. Hyafil, F.; Cornily, J. C.; Feig, J. E.; Gordon, R.; Vucic, E.; Amirbekian, V.; Fisher, E. A.; Fuster, V.; Feldman, L. J.; Fayad, Z. A., Noninvasive detection of macrophages using a nanoparticulate contrast agent for computed tomography. *Nat Med* 2007, 13, 636-41.
45. Shi, H.; Varghese, T.; Mitchell, C. C.; McCormick, M.; Dempsey, R. J.; Kliever, M. A., In vivo attenuation and equivalent scatterer size parameters for atherosclerotic carotid plaque: preliminary results. *Ultrasonics* 2009, 49, 779-85.
46. DeMaria, A. N.; Narula, J.; Mahmud, E.; Tsimikas, S., Imaging vulnerable plaque by ultrasound. *J Am Coll Cardiol* 2006, 47, C32-9.
47. Inaba, Y.; Lindner, J. R., Molecular imaging of disease with targeted contrast ultrasound imaging. *Transl Res* 2012, 159, 140-8.
48. Cui, W.; Bei, J.; Wang, S.; Zhi, G.; Zhao, Y.; Zhou, X.; Zhang, H.; Xu, Y., Preparation and evaluation of poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microbubbles as a contrast agent for myocardial contrast echocardiography. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005, 73, 171-8.
49. Lindner, J. R.; Dayton, P. A.; Coggins, M. P.; Ley, K.; Song, J.; Ferrara, K.; Kaul, S., Noninvasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles. *Circulation* 2000, 102, 531-8.
50. Ferrante, E. A.; Pickard, J. E.; Rychak, J.; Klibanov, A.; Ley, K., Dual targeting improves microbubble contrast agent adhesion to VCAM-1 and P-selectin under flow. *J Control Release* 2009, 140, 100-7.
51. Kaufmann, B. A.; Sanders, J. M.; Davis, C.; Xie, A.; Aldred, P.; Sarembock, I. J.; Lindner, J. R., Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 2007, 116, 276-84.
52. Zweers, M. L.; Engbers, G. H.; Grijpma, D. W.; Feijen, J., In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *J Control Release* 2004, 100, 347-56.
53. E., A.; R., G.; E., D., Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics* 1992, 87, 247-253.
54. Bendas, G.; Krause, A.; Bakowsky, U.; Vogel, J.; Rothe, U., Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm* 1999, 181, 79-93.
55. Bakowsky, H.; Richter, T.; Kneuer, C.; Hoekstra, D.; Rothe, U.; Bendas, G.; Ehrhardt, C.; Bakowsky, U., Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1778, 242-9.
56. Manjappa, A. S.; Chaudhari, K. R.; Venkataraju, M. P.; Dantuluri, P.; Nanda, B.; Sidda, C.; Sawant, K. K.; Murthy, R. S., Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release* 2011, 150, 2-22.

57. Chouai, A.; Simanek, E. E., Kilogram-scale synthesis of a second-generation dendrimer based on 1,3,5-triazine using green and industrially compatible methods with a single chromatographic step. *J Org Chem* 2008, 73, 2357-66.
58. R., M.; R., S., *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1996.
59. *Zetasizer Nano User Manual MANO317 Issue 4.0*. Malvern Instruments Ltd: 2008.
60. Patil, S.; Martinez, N. F.; Lozano, J. R.; Garcia, R., Force microscopy imaging of individual protein molecules with sub-pico Newton force sensitivity. *J Mol Recognit* 2007, 20, 516-23.
61. Sitterberg, J.; Ozcetin, A.; Ehrhardt, C.; Bakowsky, U., Utilising atomic force microscopy for the characterisation of nanoscale drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2010, 74, 2-13.
62. Kuntsche, J.; Horst, J. C.; Bunjes, H., Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2011, 417, 120-37.
63. Fukami, A.; Adachi, K., A new method of preparation of a self-perforated micro plastic grid and its application. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1965, 14, 112-8.
64. Kaiser, N.; Kimpfler, A.; Massing, U.; Burger, A. M.; Fiebig, H. H.; Brandl, M.; Schubert, R., 5-Fluorouracil in vesicular phospholipid gels for anticancer treatment: entrapment and release properties. *Int J Pharm* 2003, 256, 123-31.
65. Riedel, E., *Anorganische Chemie, 4. Auflage*. de Gruyter: 1999.
66. Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Instrumentelle Analytik: Grundlagen – Geräte – Anwendungen*. Springer Verlag: 1996.
67. Kollmann, C.; Bezemer, R. A.; Fredfeldt, K. E.; Schaarschmidt, U. G.; Teirlinck, C. J., [A test object for quality control of the instrument for doppler (duplex) ultrasonography, based on the Draft IEC 61685 Standard]. *Ultraschall Med* 1999, 20, 248-57.
68. Govindjee, S.; Sackman, J. L., On the use of continuum mechanics to estimate the properties of nanotubes. *Solid State Communications* 1999, 110, 227-230.
69. Vinckier, A.; Semenza, G., Measuring elasticity of biological materials by atomic force microscopy. *FEBS Lett* 1998, 430, 12-6.
70. Domke, J. Mikromechanische Eigenschaften dünner Polymerfilme und lebender Zellen. LMU München, 2000.
71. Hertz, H., Über die Berührung fester elastischer Körper. *Journal für reine und angewandte Mathematik* 1881, 92, 156-171.
72. Sneddon, I. N., The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* 1965, 3, 47-57.
73. Tranchida, D.; Piccarolo, S.; Soliman, M., Nanoscale mechanical characterization of polymers by AFM nanoindentations: critical approach to the elastic characterization. *Macromolecules* 2006, 39, 4547-4556.
74. Hinterdorfer, P.; Baumgartner, W.; Gruber, H. J.; Schilcher, K.; Schindler, H., Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 3477-81.
75. Marxer, E. E.; Brüssler, J.; Becker, A.; Schümmelfeder, J.; Schubert, R.; Nimsky, C.; Bakowsky, U., Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agents. *Eur J Pharm Biopharm* 2011, 77, 430-7.
76. Leal, C.; Rögnvaldsson, S.; Fossheim, S.; Nilssen, E. A.; Topgaard, D., Dynamic and structural aspects of PEGylated liposomes monitored by NMR. *J Colloid Interface Sci* 2008, 325, 485-93.
77. Cullis, P. R.; De Kruijff, B., Polymorphic phase behaviour of lipid mixtures as detected by ³¹P NMR. Evidence that cholesterol may destabilize bilayer structure in

- membrane systems containing phosphatidylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 1978, 507, 207-18.
78. Smith, D. A.; Vaidya, S. S.; Kopechek, J. A.; Huang, S. L.; Klegerman, M. E.; McPherson, D. D.; Holland, C. K., Ultrasound-triggered release of recombinant tissue-type plasminogen activator from echogenic liposomes. *Ultrasound Med Biol* 2010, 36, 145-57.
79. Talu, E.; Lozano, M. M.; Powell, R. L.; Dayton, P. A.; Longo, M. L., Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device. *Langmuir* 2006, 22, 9487-90.
80. Allen, T. M.; Hansen, C., Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta* 1991, 1068, 133-41.
81. Anabousi, S.; Laue, M.; Lehr, C. M.; Bakowsky, U.; Ehrhardt, C., Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 2005, 60, 295-303.
82. Tabatt, K.; Kneuer, C.; Sameti, M.; Olbrich, C.; Müller, R. H.; Lehr, C. M.; Bakowsky, U., Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *J Control Release* 2004, 97, 321-32.
83. Rupp, C.; Steckel, H.; Müller, B. W., Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: the influence of surfactants with different molecule structures. *Int J Pharm* 2010, 387, 120-8.
84. Johnsson, M.; Edwards, K., Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly(ethylene glycol)-phospholipids. *Biophys J* 2003, 85, 3839-47.
85. Garbuzenko, O.; Barenholz, Y.; Prieve, A., Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 2005, 135, 117-29.
86. Garbuzenko, O.; Zalipsky, S.; Qazen, M.; Barenholz, Y., Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. *Langmuir* 2005, 21, 2560-8.
87. Schroeder, A.; Sigal, A.; Turjeman, K.; Barenholz, Y., Using PEGylated nano-liposomes to target tissue invaded by a foreign body. *J Drug Target* 2008, 16, 591-5.
88. Ickenstein, L. M.; Arfvidsson, M. C.; Needham, D.; Mayer, L. D.; Edwards, K., Disc formation in cholesterol-free liposomes during phase transition. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1614, 135-8.
89. Schroeder, A.; Kost, J.; Barenholz, Y., Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. *Chem Phys Lipids* 2009, 162, 1-16.
90. Schroeder, A.; Avnir, Y.; Weisman, S.; Najajreh, Y.; Gabizon, A.; Talmon, Y.; Kost, J.; Barenholz, Y., Controlling liposomal drug release with low frequency ultrasound: mechanism and feasibility. *Langmuir* 2007, 23, 4019-25.
91. Schubert, R.; Beyer, K.; Wolburg, H.; Schmidt, K. H., Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry* 1986, 25, 5263-9.
92. Soong, R.; Macdonald, P. M., PEG molecular weight and lateral diffusion of PEG-ylated lipids in magnetically aligned bicelles. *Biochim Biophys Acta* 2007, 1768, 1805-14.
93. Blume, G.; Cevc, G., Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1029, 91-7.
94. Cintas, P.; Nguyen, F.; Boneu, B.; Larrue, V., Enhancement of enzymatic fibrinolysis with 2-MHz ultrasound and microbubbles. *J Thromb Haemost* 2004, 2, 1163-6.
95. Schumann, P. A.; Christiansen, J. P.; Quigley, R. M.; McCreery, T. P.; Sweitzer, R. H.; Unger, E. C.; Lindner, J. R.; Matsunaga, T. O., Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi. *Invest Radiol* 2002, 37, 587-93.

96. Spengos, K.; Behrens, S.; Daffertshofer, M.; Dempfle, C. E.; Hennerici, M., Acceleration of thrombolysis with ultrasound through the cranium in a flow model. *Ultrasound Med Biol* 2000, 26, 889-95.
97. Kim, D. H.; Costello, M. J.; Duncan, P. B.; Needham, D., Mechanical properties and microstructure of polycrystalline phospholipid monolayer shells: Novel solid microparticles. *Langmuir* 2003, 19, 8455-8466.
98. Du, H.; Chandaroy, P.; Hui, S. W., Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1326, 236-48.
99. Efremova, N. V.; Bondurant, B.; O'Brien, D. F.; Leckband, D. E., Measurements of interbilayer forces and protein adsorption on uncharged lipid bilayers displaying poly(ethylene glycol) chains. *Biochemistry* 2000, 39, 3441-51.
100. Langworthy, T. A.; Smith, P. F.; Mayberry, W. R., Lipids of *Thermoplasma acidophilum*. *J Bacteriol* 1972, 112, 1193-200.
101. Patel, G. B.; Sprott, G. D., Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. *Crit Rev Biotechnol* 1999, 19, 317-57.
102. Demos, S. M.; Alkan-Onyuksel, H.; Kane, B. J.; Ramani, K.; Nagaraj, A.; Greene, R.; Klegerman, M.; McPherson, D. D., In vivo targeting of acoustically reflective liposomes for intravascular and transvascular ultrasonic enhancement. *J Am Coll Cardiol* 1999, 33, 867-75.
103. Huang, S. L.; Hamilton, A. J.; Nagaraj, A.; Tiukinhoy, S. D.; Klegerman, M. E.; McPherson, D. D.; Macdonald, R. C., Improving ultrasound reflectivity and stability of echogenic liposomal dispersions for use as targeted ultrasound contrast agents. *J Pharm Sci* 2001, 90, 1917-26.
104. Huang, S. L., Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008, 60, 1167-76.
105. Paik, P.; Kar, K. K.; Deva, D.; Sharma, A., Measurement of mechanical properties of polymer nanospheres by atomic force microscopy: effects of particle size. *Micro & Nano Letters* 2007, 2, 72-77.
106. Reed, A. M.; Gilding, D. K., Biodegradable polymers for use in surgery - poly(glycolic)/poly(lactic acid) homo and copolymers: 2. In vitro degradation. *Polymer* 1981, 22, 494-498.
107. Seth, A.; Katti, D. S., A one-step electrospray-based technique for modulating morphology and surface properties of poly(lactide-co-glycolide) microparticles using Pluronics®. *Int J Nanomedicine* 2012, 7, 5129-36.
108. Panyam, J.; Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2012.
109. Cotton, N. J.; Egan, M. J.; Brunelle, J. E., Composites of poly(DL-lactide-co-glycolide) and calcium carbonate: in vitro evaluation for use in orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A* 2008, 85, 195-205.
110. Dubreuil, F.; Elsner, N.; Fery, A., Elastic properties of polyelectrolyte capsules studied by atomic-force microscopy and RICM. *Eur Phys J E Soft Matter* 2003, 12, 215-21.
111. Middleton, J. C.; Tipton, A. J., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000, 21, 2335-46.
112. Van de Velde, K.; Kiekens, P., Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing* 2002, 21, 433-442.
113. Miller, R. A.; Brady, J. M.; Cutright, D. E., Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res* 1977, 11, 711-9.
114. Ge, Z.; Goh, J. C.; Wang, L.; Tan, E. P.; Lee, E. H., Characterization of knitted polymeric scaffolds for potential use in ligament tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 2005, 16, 1179-92.

115. Widmer, M. S.; Gupta, P. K.; Lu, L.; Meszlenyi, R. K.; Evans, G. R.; Brandt, K.; Savel, T.; Gurlek, A.; Patrick, C. W.; Mikos, A. G., Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials* 1998, 19, 1945-55.
116. Williams, D. F., Review: Biodegradation of surgical polymers. *Journal of Material Science* 1982, 17, 1233-1246.
117. Park, T. G., Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: effect of copolymer composition. *Biomaterials* 1995, 16, 1123-30.
118. Spenlehauer, G.; Vert, M.; Benoit, J. P.; Boddaert, A., In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* 1989, 10, 557-63.
119. Barkhausen, J.; Ebert, W.; Heyer, C.; Debatin, J. F.; Weinmann, H. J., Detection of atherosclerotic plaque with Gadofluorine-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003, 108, 605-9.
120. Yu, X.; Song, S. K.; Chen, J.; Scott, M. J.; Fuhrhop, R. J.; Hall, C. S.; Gaffney, P. J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M., High-resolution MRI characterization of human thrombus using a novel fibrin-targeted paramagnetic nanoparticle contrast agent. *Magn Reson Med* 2000, 44, 867-72.
121. Sathyanarayana, S.; Carlier, S.; Li, W.; Thomas, L., Characterisation of atherosclerotic plaque by spectral similarity of radiofrequency intravascular ultrasound signals. *EuroIntervention* 2009, 5, 133-9.
122. Hamilton, A. J.; Huang, S. L.; Warnick, D.; Rabbat, M.; Kane, B.; Nagaraj, A.; Klegerman, M.; McPherson, D. D., Intravascular ultrasound molecular imaging of atheroma components in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2004, 43, 453-60.
123. Ibañez, B.; Badimon, J. J.; Garcia, M. J., Diagnosis of atherosclerosis by imaging. *Am J Med* 2009, 122, S15-25.
124. Hitchcock, K. E.; Caudell, D. N.; Sutton, J. T.; Klegerman, M. E.; Vela, D.; Pyne-Geithman, G. J.; Abruzzo, T.; Cyr, P. E.; Geng, Y. J.; McPherson, D. D.; Holland, C. K., Ultrasound-enhanced delivery of targeted echogenic liposomes in a novel ex vivo mouse aorta model. *J Control Release* 2010, 144, 288-95.
125. Estes, J. M.; Quist, W. C.; Lo Gerfo, F. W.; Costello, P., Noninvasive characterization of plaque morphology using helical computed tomography. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998, 39, 527-34.
126. Flacke, S.; Fischer, S.; Scott, M. J.; Fuhrhop, R. J.; Allen, J. S.; McLean, M.; Winter, P.; Sicard, G. A.; Gaffney, P. J.; Wickline, S. A.; Lanza, G. M., Novel MRI contrast agent for molecular imaging of fibrin: implications for detecting vulnerable plaques. *Circulation* 2001, 104, 1280-5.
127. Le Floc'h, S.; Cloutier, G.; Finet, G.; Tracqui, P.; Pettigrew, R. I.; Ohayon, J., On the potential of a new IVUS elasticity modulus imaging approach for detecting vulnerable atherosclerotic coronary plaques: in vitro vessel phantom study. *Physics in Medicine and Biology* 2012, 55, 5701-5721.
128. Komiyama, N.; Berry, G. J.; Kolz, M. L.; Oshima, A.; Metz, J. A.; Preuss, P.; Briskin, A. F.; Pauliina Moore, M.; Yock, P. G.; Fitzgerald, P. J., Tissue characterization of atherosclerotic plaques by intravascular ultrasound radiofrequency signal analysis: an in vitro study of human coronary arteries. *Am Heart J* 2000, 140, 565-74.
129. Klibanov, A. L.; Hughes, M. S.; Villanueva, F. S.; Jankowski, R. J.; Wagner, W. R.; Wojdyla, J. K.; Wible, J. H.; Brandenburger, G. H., Targeting and ultrasound imaging of microbubble-based contrast agents. *MAGMA* 1999, 8, 177-84.
130. Demos, S. M.; Onyüksel, H.; Gilbert, J.; Roth, S. I.; Kane, B.; Jungblut, P.; Pinto, J. V.; McPherson, D. D.; Klegerman, M. E., In vitro targeting of antibody-conjugated echogenic liposomes for site-specific ultrasonic image enhancement. *J Pharm Sci* 1997, 86, 167-71.

131. Lindner, J. R., Detection of inflamed plaques with contrast ultrasound. *Am J Cardiol* 2002, 90, 32L-35L.

KAPITEL 10: ANHANG

10. ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AFM	Atomic Force Microscope (Rasterkraftmikroskop)
AK	Antikörper
B	Bor
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
CC	Cyanurchlorid
CH	Cholesterol
CT	Computertomographie
δ	Eindrücktiefe
D ₂ O	Deuterium Oxide (“schweres Wasser”)
dB	Dezibel
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DPPE	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DPPE-CC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(Cyanur)
DPPE-MPEG5000	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Methoxy(Polyethylenglycol)-5000]
DPPG	1,2-Dipalmitoyl-sn- Glycero-3-Phosphoglycerol
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DSPE-PEG2000-CC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-[Cyanur-(Polyethylenglycol)2000]
E	Elastizitätsmodul, Young Modul
F	Fluor
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
GPa	Gigapascal
H	Wasserstoff

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hz	Hertz
ICAM	intercellular cell adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
K	Kelvin
kHz	Kilohertz
LDA	Laser Doppler Anemometrie
LDL	low density lipoprotein
M	Molar (Mol pro Liter)
MgCl ₂ x6H ₂ O	Magnesiumchloridhexahydrat
MHz	Megahertz
MI	Mechanischer Index
MMP	matrix metalloproteinase
mol %	molares Verhältnis in Prozent
mol/l	Mol pro Liter
MPa	Megapascal
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRT	Magnetresonanztomographie
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µs	Mikrosekunde
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mg/ml	Milligram pro Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
N	Stickstoff
nN	Nanonewton
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
NO	nitric oxide

NP	Nanopartikel
N/m	Newton pro Meter
O/W	Öl in Wasser
P	Phosphor
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PCS	Photon Correlation Spectroscopy (Photonenkorrelationspektroskopie)
Pdi	Polydispersitätsindex
PEG40S	Polyethylenglykol-(40)-Stearat
PET	positron emission tomography
pH	Potentia Hydrogenii
PGA	Polyglycolicacid
PLA	Polylacticacid
PLLA	Poly(L)Lacticacid
PLGA	Poly(D,L-lactid acid- <i>co</i> -glykolic acid)
pN	Piconewton
ppm	Parts Per Million
PVA	Polyvinylalkohol
rpm	Revolutions Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
ROI	Region Of Interest
RT	Raumtemperatur
Si	Silicium
Si ₃ N ₄	Siliziumnitrid
T	Tesla
TEL	Tetraetherlipid
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
tPA	tissue Plasminogen Activator
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USPIO	Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle
v	Poisson-Zahl
VCAM	vascular cell adhesion molecule
W/O	Wasser in Öl
Z-Ave	Z-Average (Mittlerer Durchmesser)

10.2 TABELLEN

Mittlere Grauwerte und Messzeitpunkte der liposomalen Formulierungen nach Herstellung mit dem Ultraschallbad sowie von SonoVue®.

Lipidmischung [mol%]	Mittlerer Grauwert [%]	Messzeitpunkt [Tage nach Herstellung]	Messbedingungen
SonoVue®	100 ± 14,2	0	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4, Tris
Phospholipon	4,9	56	50 dB, 1,6 MHz, MI 0,5, Tris
DPPC/CH 70:30	7,1 ± 7,3	2/3	44/40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DPPC/PEG40S 98:2	18,0 ± 17,7	2-11	42/44/40/ dB, 1,6/1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DSPC/PEG40S 98:2	9,5 ± 6,6	2-11	40/44/40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4, Tris

Mittlere Grauwerte und Messzeitpunkte der liposomalen Formulierungen nach Herstellung mit dem Ultraschallstab.

Lipidmischung [mol%]	Mittlerer Grauwert [%]	Messzeitpunkt [Tage nach Herstellung]	Messbedingungen
DPPC/PEG40S 98:2	25,6 ± 14,2	2/3	40 dB, 1,4, MHz, MI
91:9	24,9 ± 8,6	2/3	0,4, Wasser
DSPC/PEG40S 98:2	60,6 ± 23,7	2/3	40 dB, 1,4, MHz, MI
91:9	66,4 ± 18,1	2/3	0,4, Wasser
DSPC/PEG40S/DPPE-CC	69,0 ± 34,9	1/2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4 Wasser

10. ANHANG

91:9:10	86,3 ± 3,9	2	Tris
	80,2	1	FCS
40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4			
DSPC/PEG40S/DPPE-CC-AK 91:9:10	34,9 ± 32,6	1/2	Wasser
	36,9 ± 19,7	2	Tris
	38,3	1	FCS
40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4			
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC 91:9:10	89,5 ± 36,0	1/2	Wasser
	85,9 ± 18,3	2	Tris
	53,9	1	FCS
40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4			
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC-AK 91:9:10	36,5 ± 33,0	1/2	Wasser
	52,2 ± 45,0	2	Tris
	43,7	1	FCS

Herstellung von DPPC/PEG40S und DSPC/PEG40S (je 91:9) mit dem Ultraschallbad und unterschiedlich langen Beschallungszeiten inklusive der gefriergetrockneten Formulierungen.

Lipidmischung [mol%]	Beschallungszeit [Minuten]	Mittlerer Grauwert ± Stabw [%]	Mittlerer Grauwert ± Stabw [%]
Gefriergetrocknet			
SonoVue®	--	100	
DPPC/PEG40S (91:9)	1	7,28 ± 4,99	63,32 ± 11,63
	2	11,01 ± 11,18	39,55 ± 11,42
	3	5,32 ± 2,17	40,19 ± 39,31
	4	3,72 ± 0,31	54,05 ± 25,26
	5	2,65 ± 3,06	25,88 ± 28,96
DSPC/PEG40S (91:9)	1	1,69 ± 2,93	18,90 ± 12,78
	2	3,04 ± 0,69	12,56 ± 11,02
	3	4,32 ± 1,03	13,58 ± 2,05
	4	3,71 ± 2,46	14,98 ± 7,86
	5	2,26 ± 0,45	7,97 ± 5,28

Beschallungsprotokoll bei Herstellung mit dem Ultraschallstab mit den resultierenden Grauwerten inklusive der gefriergetrockneten Formulierungen.

Lipidmischung [mol%]	Amplitude konst. Schall [%]	Zeit gepulster Schall [Sekunden]	Mittlerer Grauwert ± Stabw [%]	Mittlerer Grauwert ± Stabw [%]
Gefriergetrocknet				
SonoVue®	--		100	
DPPC/PEG40S (91:9)	10	10	35,63 ± 30,70	63,36 ± 36,33
		20	25,25 ± 19,16	55,24 ± 30,57
		30	16,66 ± 5,27	59,63 ± 38,44
		40	26,71 ± 22,45	71,07 ± 22,74
	30	10	24,61 ± 12,27	65,90 ± 23,34
		20	18,37 ± 15,50	62,39 ± 30,41
		30	20,68 ± 19,61	64,29 ± 15,97
		40	37,31 ± 20,21	56,05 ± 19,74
	50	10	72,35 ± 10,48	68,34 ± 23,03
		20	38,30 ± 24,14	49,33 ± 23,76
		30	39,09 ± 36,97	64,47 ± 24,04
		40	77,33 ± 24,45	63,50 ± 20,42
	10	10	57,45 ± 28,81	56,64 ± 21,12
		20	51,30 ± 23,98	47,76 ± 23,38
		30	52,88 ± 39,63	52,36 ± 19,21
		40	48,97 ± 23,30	49,79 ± 21,38
DSPC/PEG40S (91:9)	30	10	45,42 ± 19,01	66,12 ± 24,94
		20	40,79 ± 29,24	64,05 ± 10,31
		30	48,72 ± 7,06	62,58 ± 15,39
		40	27,54 ± 20,79	55,46 ± 23,03
	50	10	49,65 ± 30,27	61,05 ± 13,31
		20	34,84 ± 10,72	38,84 ± 27,28
		30	40,83 ± 24,79	58,83 ± 36,23
		40	49,46 ± 29,94	48,94 ± 14,85

Grauwerte und Messbedingungen der Ultraschallkontraste der verschiedenen Lipid-Mischungen, inklusive der Werte nach dem Gefriertrocknen (gt = gefriergetrocknet).

Lipidmischung [mol%]	Mittlerer Grauwert [%]	Messzeitpunkt [Tage nach Herstellung]	Messbedingungen
SonoVue®	100 ± 14,2	0	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DPPC/CH/TEL	0	2	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	19,5	0	Tris
DPPC/PEG40S/TEL 98:2:2	0	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	74,2	0	Tris
DPPC/PEG40S/TEL 98:2:5	77,4	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	81,3	0	Tris
DPPC/PEG40S/TEL 98:2:10	81,3	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	103,1	0	Tris
DSPC/PEG40S/TEL 98:2:2	28,0	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	92,7	0	Tris
DSPC/PEG40S/TEL 98:2:5	32,8	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	44,0	0	Tris
DSPC/PEG40S/TEL 98:2:10	25,8	5	46 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	55,6	0	Tris
DPPC/DPPE-MPEG5000	4,4	7	44 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	23,9	0	Tris
DSPC/DPPE-MPEG5000	0	7	44 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,
gt	61,5	0	Tris
DPPC/CH	7,1 ± 7,3	2/3	44 dB
gt	12,1	0	40 dB
			1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DPPC/PEG40S	18,0 ± 17,7	2-11	44 dB
gt	55,0	0	40 dB
			1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DSPC/PEG40S	9,5 ± 6,6	2-11	44 dB
gt	53,8	0	40 dB
			1,4 MHz, MI 0,4, Tris
DPPC/PEG40S/DPPE	0	5	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4, Wasser
DSPC/PEG40S/DPPE	46,4	5	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,

				Wasser
DMPC/PEG40S				
98:2	0	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
91:9	0		Wasser	
DPPE/PEG40S				
98:2	25,4	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
91:9	18,7		Wasser	
DPPG/PEG40S				
98:2	0	1	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
91:9	0		Wasser	
DOTAP/PEG40S				
98:2	0	1	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
91:9	0		Wasser	
DSPC/PEG40S/DPPE-CC				
91:9:10	86,3 ± 3,9	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
gt	60,6	0	Tris	
DSPC/PEG40S/DPPE-CC-AK				
91:9:10	36,9 ± 19,7	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
gt	47,7	0	Tris	
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC				
91:9:10	85,9 ± 18,3	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
gt	16,6	0	Tris	
DSPC/PEG40S/DSPE-PEG2000-CC-AK				
91:9:10	52,2 ± 45,0	2	40 dB, 1,4 MHz, MI 0,4,	
gt	35,8	0	Tris	

10.3 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

E. Marxer, J. Brüßler, A. Becker, C. Nimsky, U. Bakowsky

Fibrin Targeting with Ultrasound Active Antibody-Conjugated Liposomes

Scientia Pharmaceutica, **2010**, 78:675

(Abstracts of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT),
Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering,
September 16th – 18th 2010, Graz, Austria)

E. Marxer*, J. Brüßler*, A. Becker, J. Schümmelfeder, R. Schubert, C. Nimsky, U. Bakowsky

**Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions
as contrast agents**

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2011**, 77(3):430-72011

(* gemeinsamer Artikel)

J. Schäfer*, E. Marxer*, U. Bakowsky

Force spectroscopy with BSA functionalized cantilevers on TiO₂ nanoparticles

Physica Status Solidi A, **2011**, 208(6): 1320–1326

(*gemeinsamer Artikel)

Co-Autorenschaften bei Publikationen

J. Brüßler, E. Marxer, A. Becker, R. Schubert, C. Nimsky, U. Bakowsky

Determination of the structure of a new nanoscaled ultrasound contrast agent

Scientia Pharmaceutica, **2010**, 78:570

(Abstracts of the 8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT),
Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering,
September 16th – 18th 2010, Graz, Austria)

A. Becker, E. Marxer, J. Brüßler, A.S. Hoormann, D. Kuhnt, U. Bakowsky, C. Nimsky

Ultrasound active nanoscaled lipid formulations for thrombus lysis

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2011**, 77(3):424-429

J. Schäfer, C. Schulze, E.E.J. Marxer, U.F. Schäfer, W. Wohlleben, U. Bakowsky, C-M. Lehr
Atomic Force Microscopy and Analytical Ultracentrifugation for Probing Nanomaterial Protein Interactions

ACS Nano, **2012**, 6 (6): 4603–4614

R. Reul, J. Nguyen, A. Biela, E. Marxer, U. Bakowsky, G. Klebe, T. Kissel

Biophysical and biological investigation of DNA nano-complexes with a non-toxic, biodegradable amine-modified hyperbranched polyester

International Journal of Pharmaceutics, **2012**, 436: 97– 105

Vorträge

E. Marxer, J. Sitterberg, U. Bakowsky

Elasticity measurements on PLGA nanoparticles – a Force Microscopy study

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 19.-20. 3. **2009**, Halle, Germany

E. Marxer*, J. Brüßler*, A. Becker, U. Bakowsky

Development and characterization of ultrasound active liposomes for sonothrombolysis

Mountain-Sea-Liposome Workshop, 28.9.-2.10. **2009**, Ameland, Niederlande

(* gemeinsamer Vortrag)

E.E.J. Marxer, J. Brüßler, A. Becker, C. Nimsky, U. Bakowsky

Identifying the vulnerable plaque with a new nanoscaled targeted ultrasound contrast agent – an in vitro study

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 15.–16.3. **2011**, Jena, Deutschland

Posterpräsentationen

E. Marxer, J. Sitterberg, U. Bakowsky

PLGA nanoparticles prepared by a salting -out method – Physico-chemical properties and characterization

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 4.-5.3.2008, Braunschweig, Deutschland

E. Marxer, J. Brüßler, A. Becker, U. Bakowsky

Development of new ultrasound active liposomes for sonothrombolysis and their characterization

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

E. Marxer, J. Schäfer

Determination of the interaction between BSA and inorganic particles by atomic force microscopy

Materialforschungstag Mittelhessen 2010, 9.7.2010, Marburg, Deutschland

J. Schäfer*, E. Marxer*, U. Bakowsky

Atomic force microscopy on inorganic nanoparticles with BSA functionalized cantilevers

Engineering of Functional Interfaces (ENFI), 15.-16.7.2010, Rauischholzhausen, Deutschland
(* gemeinsames Poster)

E. Marxer, J. Brüßler, A. Becker, C. Nimsky, U. Bakowsky

Fibrin Targeting with Ultrasound Active Antibody-Conjugated Liposomes

8th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology (CESPT), Satellite Symposium: 4th International Graz Congress on Pharmaceutical Engineering, 16.-18.9.2010, Graz, Österreich

Co-Autorenschaften bei Posterbeiträgen

J. Brüßler, E.E.J. Marxer, K. Zöllner, A. Becker., U. Bakowsky

Influencing factors on the echogenicity of ultrasound active liposomes

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

J. Brüßler, C. Hobler, E.E.J. Marxer, M. Keusgen, U. Bakowsky

Implementation of semiconductor nanoparticles into lipid double-layer of functional liposomes

Engineering of Functional Interfaces (ENFI), 15.-16.7.2010, Rauischholzhausen, Deutschland

A. Becker, C. Kappus, E.E.J. Marxer, J. Brüßler, U. Bakowsky, C. Nimsky

Contrast Properties of nanoscaled liposomes using phased inversion harmonic Imaging

Controlled Release Society (CRS), Germany Local Chapter, 23.-24.3.2010, Saarbrücken, Deutschland

A. Becker, J. Brüßler, D. Kuhnt, E.E.J. Marxer, U. Bakowsky, C. Nimsky

Homogeneity of new nanoscaled ultrasound contrast agents in medical ultrasound

Engineering of Functional Interfaces (ENFI), 15.-16.7.2010, Rauischholzhausen, Deutschland

10.4 LEBENSLAUF

Diese Seite (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung

10.5 DANKSAGUNG

Ich danke...

... besonders meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Udo Bakowsky für die Betreuung während der Promotion, die interessante Themenstellung, den vielen Ideen und Ratschläge und auch für den gelassenen Freiraum, eigene Ideen zu entwickeln und umzusetzen.

... Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen für die Zusammenarbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens sowie für die Leitung der Prüfungskommission bei der Disputation.

... Frau Prof. Dr. Maike Petersen und Herrn Prof. Dr. Klaus Kuschinsky für die Übernahme der Aufgabe als Nebenfachprüfer.

... Herrn Prof. Dr. Christopher Nimsky für das interessante Kooperationsprojekt und die Bereitstellung des Ultraschallgerätes.

... Herrn Dr. Andreas Becker für die wundervolle Zusammenarbeit bei unserem Kooperationsprojekt, die Freundschaft und für unseren „Colt für alle Fälle“.

... Herrn Professor Dr. Rolf Schubert und Frau Sabine Barnert für die Cryo-TEM Aufnahmen.

... Herrn Dr. Thomas Kämpchen für die Erstellung der ^{31}P -NMR-Spektren.

... Frau Sabine Motzny für die Unterstützung beim Flussmodell.

... meinen lieben Kollegen, Dr. Jens Schäfer und Dr. Eyas Dayyoub für die wertvolle Freundschaft sowie für Ideen, Rat und Unterstützung während der Promotion und außerhalb, Jana Brüßler für die Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und Diskussionen in den letzten Jahren, Anett Sommerwerk, Dr. Jarmila Jedelská-Keusgen, Jana Fuß, Susanne Lüttebrandt, Leonie Baginski, Johannes Sitterberg, Nico Harbach, Aybike Özçetin, Thomas Betz, Boris Strehlow, Maria Solovey, Bassam Al Meslmani.

... allen Kollegen des ehemaligen Arbeitskreises Kissel für die tolle Zusammenarbeit und Diskussionen und den Spaß bei Spiele- und Grillabenden; insbesondere danke ich Dr. Susanne Rösler und Dr. Nadja Bege für die Freundschaft.

Von tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen und dafür, dass sie einfach immer da sind, wenn sie gebraucht werden. Und ich danke meinem Freund für das stets offene Ohr und den nötigen Schubs zur rechten Zeit.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Entwicklung und Charakterisierung von nanoskaligen, liposomalen
Ultraschallkontrastmitteln zum Plaque-Targeting sowie Aufbau eines in vitro-Plaque-
Modells“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 14.11.2012

.....
Elena Marxer